



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis de Licenciatura de la Carrera de Ciencias Biológicas

Efecto de agentes quimioterapéuticos en los niveles de expresión de galectina-1 y galectina-3 e impacto de estas lectinas en la viabilidad de las células madre de glioma derivadas de pacientes.

Autora: Candela Castillo Olsson

Director: Dr. Guillermo Agustín Videla Richardson

Directora Asistente: Lic. Mariana Belén Vera

Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN), Instituto de Neurociencias (INEU), FLENI-CONICET.

Dr. Guillermo A. Videla Richardson

Lic. Mariana Belén Vera

Candela Castillo Olsson

Buenos Aires, diciembre 2024

Resumen

El glioblastoma (GBM) es el tumor cerebral maligno primario más frecuente y se encuentra entre los tumores más mortales que existen. Entre sus propiedades más destacadas se encuentran su gran capacidad invasiva, su radio- y quimio-resistencia y su elevada heterogeneidad, tanto intra- como inter-tumoral. Estas características hacen que la recurrencia tumoral sea prácticamente inevitable. Por estos motivos, resulta sumamente importante contar con modelos capaces de reproducir la complejidad del GBM, no sólo para comprender mejor la biología de estos tumores, sino también para contribuir al desarrollo de nuevas terapias “a medida” en el marco de la medicina personalizada.

En las últimas décadas, ha sido posible cultivar células tumorales indiferenciadas a partir de biopsias de distintos tipos de cáncer. Estas células, llamadas células madre tumorales (CMT), se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y su elevada quimio-resistencia, siendo responsables en gran medida de la progresión y la recurrencia tumoral. Por lo tanto, disponer en particular de células madre de glioblastoma (CMG) derivadas de pacientes, no sólo ofrece la posibilidad de relacionar datos celulares con información clínica, sino que también permite estudiar en mayor profundidad la biología de la principal subpoblación responsable del mal pronóstico de estos tumores. En nuestro laboratorio se han establecido y caracterizado distintas líneas de CMG derivadas de pacientes. Si bien los modelos basados en CMG no involucran al microambiente tumoral ni a las interacciones entre células tumorales y no tumorales, ofrecen la ventaja de reflejar, en cierta medida, la heterogeneidad inter-tumoral de los GBM.

En este trabajo, utilizando dos líneas de CMG derivadas de pacientes, nos propusimos estudiar cómo diferentes agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan los niveles de expresión de galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3), dos proteínas de unión a glicanos pertenecientes a la superfamilia de las lectinas. Las drogas empleadas incluyen temozolomida (TMZ), procarbina (PCB), vincristina (VCR) y lomustina (CCNU). Por otra parte, debido a que las galectinas son capaces de regular, entre otras cosas, la viabilidad celular, nos propusimos también determinar si los posibles cambios de expresión de estas proteínas en respuesta a los agentes antineoplásicos afectan el control que ellas ejercen sobre la supervivencia de las CMG.

Luego de tratar las células con TMZ, pudimos observar, en ambas líneas de CMG, que la expresión del ARNm de Gal-1 disminuyó levemente, mientras que, por el contrario, al tratarlas con VCR los niveles de Gal-1 aumentaron. En el caso de los niveles de expresión de los transcritos de Gal-3, estos no sufrieron mayores modificaciones en ninguna de las condiciones evaluadas. A nivel proteico, mediante Western blot, se observaron aumentos leves en los niveles de Gal-1 en ambas líneas, aunque estos no siempre fueron significativos. En los niveles de Gal-3, prácticamente no se observaron cambios. Sin embargo, mediante ensayos de ELISA, observamos que la secreción de Gal-1 aumentó notablemente tanto con TMZ como con VCR y CCNU, mientras que la de Gal-3 lo hizo en respuesta a TMZ y CCNU.

En cuanto a la viabilidad, fue posible confirmar que el silenciamiento de Gal-1 provoca un aumento de la muerte celular, tanto en ausencia como en presencia de TMZ. Llamativamente, determinamos que, en presencia de VCR, el silenciamiento de esta lectina no afecta la viabilidad de las CMG. Al silenciar Gal-3, o ambas lectinas de manera simultánea, no se observaron cambios en la viabilidad en ningún caso ensayado.

Por lo tanto, en este trabajo fue posible evidenciar cómo los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico pueden modular diferencialmente la expresión y secreción de las galectinas. Estos cambios en la secreción de ambas galectinas, al menos en presencia de VCR, coincidieron con alteraciones del control de la viabilidad mediado por la expresión de Gal-1. Por último, dado que estas galectinas poseen reconocidas funciones en la modulación de las respuestas inmunes antitumorales, estos resultados resaltan la importancia de analizar en mayor detalle el efecto de los agentes antineoplásicos empleados de rutina sobre el microambiente tumoral y la función inmunológica en el tratamiento de los GBM.

Effect of chemotherapeutic agents on the expression levels of galectin-1 and galectin-3 and the impact of these lectins on the viability of patients derived glioma stem cells.

Glioblastoma (GBM) is the most prevalent primary malignant brain tumor and is among the most aggressive tumors. Its defining characteristics include a high invasive capacity, resistance to radio- and chemotherapy, and a pronounced heterogeneity, both within and between tumors. These features render tumor recurrence nearly inevitable. Consequently, it is vital to develop models that accurately replicate the complexity of GBM, not only to deepen our knowledge of tumor biology but also to advance the development of personalized therapies.

In recent decades, it has become feasible to culture undifferentiated tumor cells from biopsies of various cancer types. These cells, known as tumor stem cells (TSC), are endowed with self-renewal capabilities and significant chemo-resistance, contributing substantially to tumor progression and recurrence. The availability of glioblastoma stem cells (GSCs) from diverse biopsies provides an opportunity to correlate cellular data with clinical information while facilitating a more in-depth exploration of the biology underlying the subpopulation that predominantly influences poor prognosis in GBM. Our laboratory has established and characterized various GSC lines derived from patients. Although GSC-based models do not incorporate the tumor microenvironment or the interactions between tumor and non-tumor cells, they partially reflect the inter-tumor heterogeneity of GBMs.

In this study, we utilized patient-derived GSCs to examine how different clinically-used chemotherapeutic agents influence the expression levels of galectin-1 (Gal-1) and galectin-3 (Gal-3), two glycan-binding proteins that belong to the lectin superfamily. The chemotherapeutic agents evaluated included temozolomide (TMZ), procarbazine (PCB), vincristine (VCR), and lomustine (CCNU). Additionally, given the role of galectins in regulating cell viability, we aimed to investigate whether alterations in the expression of these proteins in response to antineoplastic agents affect their control over GSC survival.

Following treatment with TMZ, we noted a significant decrease in the mRNA expression of Gal-1. In contrast, treatment with VCR resulted in an increase of the

mRNA expression of this lectin. Gal-3 transcript levels remained largely unchanged across all conditions assessed. At the protein level, only mild increments of Gal-1 were detected by Western blot analysis. However, ELISA assays revealed a significant increase in Gal-1 secretion in response to TMZ, VCR, and CCNU, while Gal-3 secretion was elevated in response to TMZ and CCNU.

With respect to cell viability, we confirmed that silencing Gal-1 leads to increased cell death in both the absence and presence of TMZ. Notably, silencing Gal-1 did not impact GSC viability in the presence of VCR. Silencing Gal-3 or both galectins simultaneously resulted in no observed changes in viability under any tested conditions.

Thus, this study demonstrates that treatments based on clinically relevant chemotherapeutic agents can differentially influence the expression and secretion of galectins. These alterations in galectin secretion, as in the case of VCR treatment, can be accompanied by changes in the Gal-1-dependent viability control. Moreover, considering the established roles of these galectins in modulating antitumor immune responses, these findings emphasize the necessity of a comprehensive analysis of the impact of routinely employed antineoplastic agents on the tumor microenvironment and the function of the immune system in the context of GBM.

Índice

Introducción.....	7
-Gliomas.....	7
-Clasificación de gliomas por la Organización Mundial de la Salud.....	7
-Células madre de Glioblastoma.....	10
-Microambiente Inmunosupresor de los Glioblastomas.....	12
-Galectinas.....	14
-Funciones de las galectinas en el sistema inmune.....	15
-Funciones de las galectinas fuera del sistema inmune.....	16
-Galectinas en gliomas.....	17
-Galectina-1 y Galectina-3 en células madre de glioblastoma: Resultados previos del laboratorio.....	18
Objetivos e Hipótesis.....	22
Materiales y métodos.....	23
-Cultivo <i>in vitro</i> de líneas celulares.....	23
-Tratamientos con agentes quimioterapéuticos.....	24
-Extracción de ARN total.....	24
-Retrotranscripción.....	25
-PCR en tiempo real.....	25
-Análisis de expresión proteica por Western Blot.....	26
-Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).....	29
-Silenciamiento génico.....	30
-Ensayos de viabilidad celular.....	31
-Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	32
-Heterogeneidad de las células madre de glioma derivada de pacientes.....	32
-Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan diferencialmente la expresión de los transcritos de Gal-1 y Gal-3 en CMG....	33
-Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico incrementan levemente los niveles proteicos de Gal-1 en CMG.....	35
-Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan diferencialmente la secreción de Gal-1 y Gal-3 en CMG.....	35
-Los siRNAs específicos para Gal-1 y Gal-3 empleados reducen significativamente los niveles de expresión de los transcritos correspondientes.....	38
-El efecto del silenciamiento de Gal-1 sobre la viabilidad de CMG depende del agente quimioterápico empleado.....	39
Discusión y conclusiones.....	41
Referencias.....	45

Introducción

- Gliomas

Los gliomas son los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) más frecuentes, representando alrededor del 40% de este tipo de neoplasias, dentro de los cuales los gliomas de alto grado forman el subtipo más común. A pesar de varias décadas de importantes adelantos en neurocirugía, radioterapia y farmacología, los gliomas de alto grado siguen siendo extremadamente agresivos y producen gran daño neurológico, encontrándose entre los tumores más mortales que existen. Entre sus propiedades más destacadas se encuentran su gran capacidad invasiva, su radio- y quimio-resistencia y su elevada heterogeneidad, tanto intra- como inter-tumoral. Además, estos tumores poseen márgenes difusos, lo que imposibilita la remoción quirúrgica total y hace que la recurrencia sea prácticamente inevitable. En el glioblastoma multiforme (GBM), el glioma maligno más frecuente, la mediana de supervivencia no supera los 14-17 meses¹⁻³.

Actualmente, el tratamiento más utilizado en los gliomas de alto grado es el llamado régimen de Stupp, que consiste en la administración conjunta de radioterapia y quimioterapia basada en temozolomida (TMZ), un agente alquilante que produce la metilación de las guaninas, impidiendo así la replicación del ADN⁴. Si bien esta combinación ha mostrado mejores resultados respecto a otros esquemas terapéuticos, el progreso de la enfermedad es prácticamente inevitable². Frente a la recurrencia tumoral, habitualmente se aplica una segunda línea de tratamiento que consiste en la combinación de lomustina (CCNU) y procarbacina (PCB), dos potentes agentes alquilantes, con vincristina (VCR), un inhibidor de la polimerización de microtúbulos⁵.

Clasificación de gliomas por la Organización Mundial de la Salud

Los gliomas son neoplasias primarias que provienen de células comprometidas en el linaje glial. Tradicionalmente, estos tumores se clasificaron según su componente celular preponderante en: astrocitomas (si predomina el componenteastroglial), oligodendrogliomas (si predomina el componente oligodendroglial), oligoastrocitomas (si están compuestos tanto por células astrogliales como por oligodendrogliales) y

ependimomas (si están compuestos por células del epéndimo)⁸. Según la agresividad y las características histológicas se los clasifica en grados (1-4), siendo el grado 1 el de menor agresividad y el 4 el de mayor agresividad. El grado del tumor se determina principalmente a partir de técnicas de inmunohistoquímica mediante las cuales se evalúa el índice mitótico, la existencia de pleomorfismo nuclear, la presencia de proliferación endotelial y de zonas necróticas¹².

El GBM representa aproximadamente el 55% de los gliomas, y el 15% de los tumores primarios del sistema nervioso. Su caracterización fue introducida en 1940 por Joachim Scherer. Hacia 1979 la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo consideraba un tumor de células embrionarias indiferenciadas⁷. Hasta hace unos años, los GBM se subdividían en primarios, si no presentan alteraciones en el gen que codifica a la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), y en secundarios, si presentan mutaciones en dicho gen. Los GBM denominados en ese entonces primarios (80-85% del total), muestran un crecimiento extremadamente rápido y, al momento del diagnóstico, no se encuentran evidencias histológicas de que provengan de tumores de menor grado. Los GBM definidos como secundarios, en cambio, habitualmente son tumores que han progresado de gliomas de menor grado. Desde 2016 la OMS incorpora parámetros moleculares a las técnicas histológicas tradicionales para la clasificación más precisa de cada tipo de tumor cerebral⁸. Esto llevó a una reorganización respecto a los gliomas difusos, meduloblastomas, y otros tipos de tumores embrionarios. También involucra un cambio en la nomenclatura, en la cual se debe nombrar el tipo de cambio molecular presente en el tumor. Esta nueva organización se esquematiza en la Figura 1.

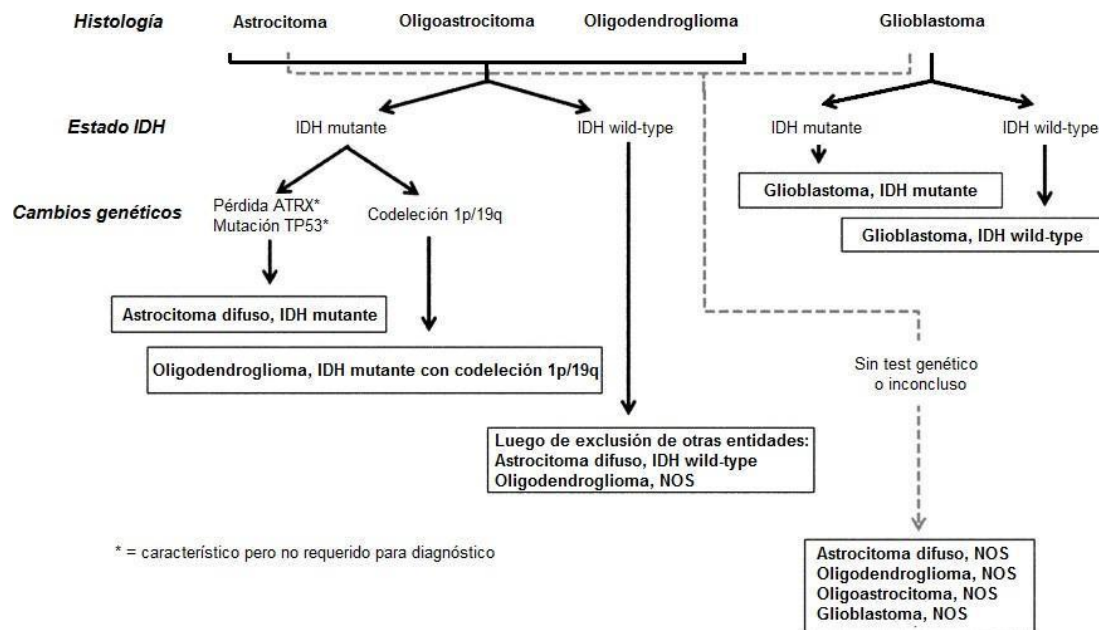


Figura 1. Esquema de clasificación según la OMS a partir del año 2016. Modificado de Louis DN. et al, 2016⁸.

Desde entonces, las mejoras en la clasificación molecular de los gliomas difusos revelaron la existencia de dos tipos principales de gliomas difusos en función del estado de los genes IDH1/2: los gliomas IDH-mutados (IDHmut) y los IDH-*wild-type* (IDHwt). Los gliomas IDHmut se diferencian particularmente de los gliomas IDHwt en la epigenética, el metabolismo, la agresividad y la respuesta a las terapias.

En 2021 la OMS amplía la tendencia iniciada en 2016, utilizando biomarcadores moleculares clave para definir entidades neoplásicas y reduce en gran medida la dependencia de las características morfológicas para la clasificación de tumores. También simplifica la terminología en torno a la clasificación de tumores, con características moleculares que dictan la clasificación, y análisis histopatológicos y moleculares conjuntos que determinan el grado. La clasificación de los gliomas difusos según esta actualización depende en gran medida de la mutación de la isocitrato deshidrogenasa (IDH1/2) y la codeleción 1p/19q, lo que da como resultado 3 grupos principales de neoplasias primarias: oligodendrogliomas (IDH mutante con co-deleción 1p/19q); astrocitoma (IDH mutante sin codeleción 1p/19q); y GBM (IDH *wild-type*). Esta clasificación diferenció aún más la enfermedad IDH mutante de la enfermedad IDH de tipo salvaje, lo que constituía una necesidad dada las grandes diferencias biológicas y clínico-patológicas entre los tumores IDH mutantes y los de

tipo IDH salvaje¹ (Figura 2). En este sentido, es importante remarcar que dentro de los gliomas de grado 4, la clasificación de la OMS 2021 reserva el término GBM exclusivamente para los tumores IDHwt, y el previamente clasificado GBM IDHmut se redefine como astrocitoma IDHmut de grado 4^{1,9}.

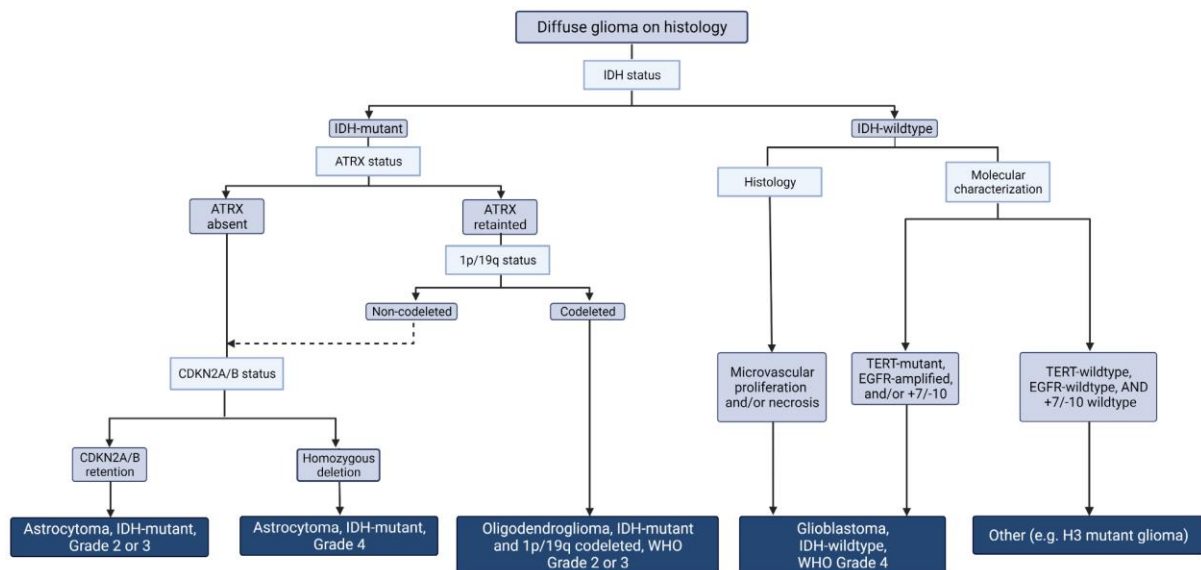


Figura 2. Esquema de clasificación según la OMS a partir del año 2021 (Whitfield, B. T. et al, 2022)¹.

Células madre de Glioblastoma

En las últimas décadas, se ha determinado que distintos tumores, incluidos los GBM, exhiben una organización jerárquica similar a la encontrada en tejidos normales. En esta organización piramidal, las células madre tumorales (CMT) se encuentran en el ápice. Estas CMT se definen funcionalmente como células tumorales capaces de autorenovarse (al menos una célula hija mantiene la identidad de las células madre tras la división) e iniciar tumores que mantienen la heterogeneidad celular del tumor parental en xenoinjertos ortotópicos^{10,11}. En nuestro laboratorio se han establecido varias líneas celulares derivadas de pacientes enriquecidas en células con fenotipo de células madre de glioma, las cuales exhiben capacidad de autorrenovación y formación de neuroesferas, potencial de diferenciación, expresión de marcadores de CMT y capacidad tumorigénica^{13,14}. Además, estas células también muestran sensibilidades particulares a los estímulos pro-apoptóticos, lo que refleja la heterogeneidad inter-tumoral de gliomas de alto grado^{14,15}.

Si bien la presencia de CMT puede implicar la transformación maligna de una célula madre de tejido normal, las CMT también pueden surgir de células más diferenciadas, desde progenitores tempranos hasta incluso, células con mayor compromiso en la diferenciación. En estos casos, mediante alteraciones genéticas y/o epigenéticas, las células logran reprogramarse y obtener acceso a programas celulares presentes en células madre²³. Se ha reportado que las células madre de GBM (CMG) poseen una mayor resistencia a la radiación ionizante respecto al resto de las células tumorales. Este fenómeno se debería, al menos en parte, a que las CMG muestran una mayor actividad de las vías de reparación del ADN mediadas por Chk1 y Chk2¹⁶. Por otra parte, se demostró que estas células son capaces de sobre-expresar determinadas bombas de eflujo presentes en las membranas celulares, pudiendo así exportar distintos agentes quimioterapéuticos, entre ellos la TMZ¹⁷. Además, gracias a su elevada plasticidad celular, las CMG son capaces de activar diversos mecanismos de escape tumoral, los cuales permiten evadir contextos adversos (muchas veces inducidos por tratamientos) que limitan la progresión tumoral^{18,19}.

En los últimos 20 años, el desarrollo de nuevos métodos de cultivo celular ha permitido establecer, con cierta facilidad y eficiencia, líneas de CMG derivadas de pacientes. Esta metodología se basa fundamentalmente en la disgregación mecánica y enzimática de biopsias y posterior incubación en un medio de cultivo definido libre de suero, que contiene los factores de crecimiento (bFGF y EGF) y nutrientes necesarios para la proliferación y la supervivencia de las CMG¹¹. Una característica de estas células es que pueden crecer en suspensión formando agregados celulares denominados neuroesferas. Sin embargo, si las placas de cultivo son tratadas con laminina o con ciertas matrices extracelulares, las esferas se adhieren a estas y las células son capaces de crecer en monocapa, manteniendo su fenotipo y capacidad proliferativa²⁰. Por otra parte, al remover el bFGF y el EGF del medio de cultivo, las CMG se diferencian espontáneamente a células de distintos linajes, tanto neurales (neuronales y astrogiales) como no neurales (músculo liso/pericitos)¹³. De hecho, en nuestro laboratorio se ha observado que diferentes líneas de CMG adoptan fenotipos astrocíticos (G08 y G09), neuronales (G09) y mesenquimales (G03)¹³ (Figura 3). Estos cultivos, tanto en suspensión como en adherencia, en comparación con las líneas celulares convencionales, no sólo permiten trabajar en pasajes bajos, sino que además reflejan con mayor fidelidad la biología del GBM²¹.

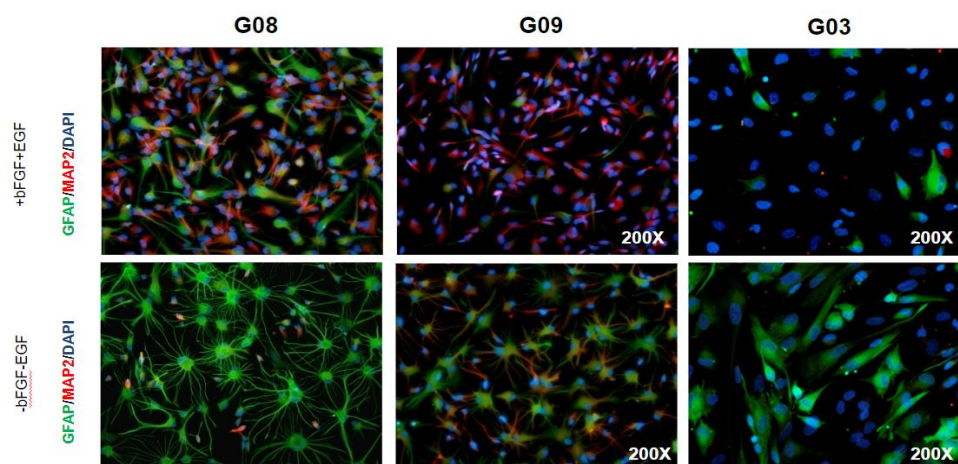


Figura 3. Fotomicrografías en las que se observan los fenotipos de CMT derivadas de GBM en condiciones que mantienen el estado indiferenciado (+EGF+bFGF) y en condiciones diferenciadas por privación de factores de crecimiento (-EGF-bFGF). Se pueden observar las morfologías de 3 de las líneas de CMT derivadas en nuestro laboratorio (G03, G08 y G09), acompañadas por la inmunomarcación de los marcadores de linaje correspondientes (GFAP: marcador de linaje astrogial; MAP2: marcador de linaje neuronal).

- Microambiente Inmunosupresor de los Glioblastomas

La inmunoterapia del cáncer basada en el uso de anticuerpos dirigidos contra los puntos de control o *checkpoints* inmunológicos (como PD-1 y CTLA-4) ha mostrado una efectividad abrumadora en muchos pacientes oncológicos²⁴. Sin embargo, los GBM no responden a estos tratamientos, indicando que en estos tumores existirían otros mecanismos capaces de generar un microambiente inmunosupresor²⁵. Los GBM son "tumores fríos" (llamados así por el escaso infiltrado de linfocitos T) debido a una baja expresión de antígenos tumorales y a la presencia de señales que limitan el acceso de las células T al lecho tumoral. Estas características pueden explicar, al menos en parte, la pobre respuesta de los pacientes con GBM a la inmunoterapia²⁶. A diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, las poblaciones inmunes más comunes que infiltran los GBM son células del linaje mieloide, principalmente macrófagos y microglia, representando hasta el 30-50% de la masa tumoral²⁷. Se ha demostrado que estas células desempeñan papeles importantes tanto en el establecimiento de un microambiente inmunosupresor, como en otros procesos que favorecen la progresión tumoral. Por ejemplo, los macrófagos asociados a tumores (MAT) favorecen la angiogénesis, la invasividad tumoral y confieren radio- y quimio-resistencia a las células tumorales. Sin embargo, en ciertas situaciones, los MAT

también pueden poseer funciones antitumorales, como la fagocitosis de células tumorales y la secreción de citoquinas proinflamatorias²⁸. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo del punto de control SIRPα/CD47 puede inducir a los MAT a fagocitar células tumorales²⁹. Por lo tanto, el bloqueo de las señales que favorecen la llegada de células mieloides al tumor y los agentes que promuevan la reprogramación de MAT pro-tumorales a antitumorales, podrían representar estrategias terapéuticas más efectivas para los tumores fríos, incluyendo los GBM²⁸. Actualmente se están realizando ensayos clínicos con drogas destinadas tanto a inhibir la llegada de células mieloides al tumor (inhibidores del receptor de quimioquinas CCR2) como a reprogramar MAT hacia fenotipos anti-tumorales (inhibidores de CSF-1R). Más aún, en muchos de estos protocolos estas drogas se combinan con inmunoterapias dirigidas a activar el sistema inmune adaptativo²⁸. De hecho, como puede observarse en la Tabla 1 y la Figura 4, las células GBM producen muchos otros factores secretados que pueden conducir al reclutamiento de macrófagos en el tumor y promover la inmunosupresión²².

Factores secretados por las CSC de GBM	Efectos sobre el sistema inmunológico
Proteína 2 similar al fibrinógeno (FGL2)	Diferenciación de células dendríticas CD103+, expresión de PD1, macrófagos inmunosupresores y expansión de MDSC, expansión de Treg
Galectina-3	Apoptosis de células T
Factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF1)	Polarización inmunosupresora de macrófagos.
Citocina inhibidora de macrófagos 1 (MIC1)	Inhibición de la fagocitosis en macrófagos y microglia.
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	Reclutamiento de MDSC y mastocitos, regulación negativa de NKG2D en células asesinas naturales y células T CD8+
Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP1/ CCL2)	Reclutamiento de microglia, migración de Treg.
osteopontina	Migración de macrófagos que soportan tumores.
periostina	Reclutamiento de GAM inmunosupresores.
Prostaglandina E2 (PGE2)	Regulación putativa de la diferenciación de células Th17.
Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1)	Regulación negativa de MHCII en células mieloides, inhibición de la proliferación de células T maduras y actividad citotóxica, proliferación de Tregs
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Inhibición de la maduración y función de las células dendríticas.
Versicano	Inducción de la expresión de MT1-MMP en microglia.
WISP1	Supervivencia de los GAM que soportan tumores

Tabla 1. Factores inmunomoduladores secretados por las CMT de GBM y sus mecanismos propuestos de supresión inmune (Mitchell, K. et al. 2021)²².

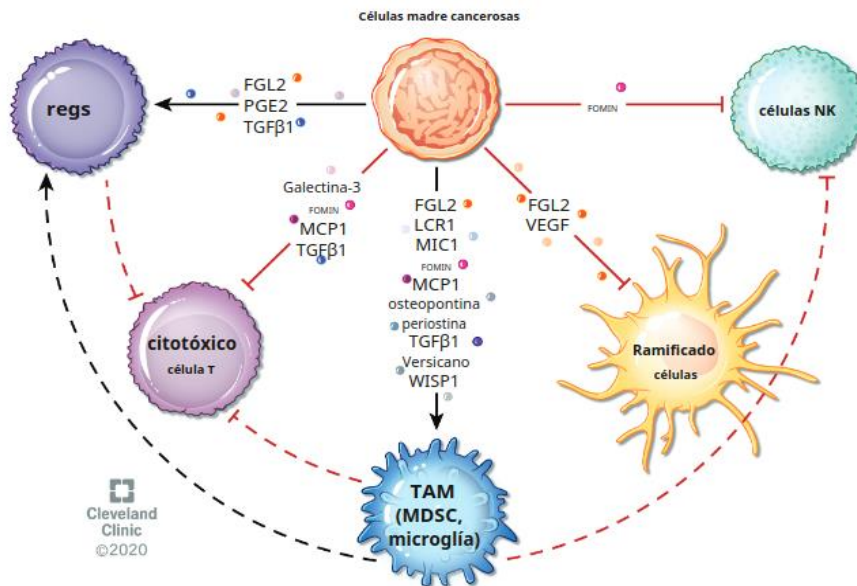


Figura 4. Inmunosupresión del sistema inmune por CMT mediante la secreción de factores que inhiben directa e indirectamente las respuestas inmunitarias (Mitchell, K. et al. 2021)²².

- Galectinas

Las galectinas constituyen una familia de proteínas de unión a carbohidratos perteneciente a la superfamilia de las lectinas animales (proteínas de unión a azúcares). Las galectinas poseen la capacidad de unirse a residuos sacarídicos presentes en diferentes glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular. Estas proteínas reconocen en forma específica unidades repetitivas [Galβ1-4NAcGlc] presentes en N- y O- glicanos a través de un dominio altamente conservado de 135 aminoácidos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Se han identificado 15 galectinas en mamíferos y, si bien todas tienen afinidad por residuos [Galβ1-4NAcGlc], cada una de ellas tiene afinidades diferenciales hacia otros residuos glicosídicos, lo cual les confiere especificidades preferenciales³². A su vez, las galectinas son capaces de formar dímeros o multímeros^{33,30}, lo que les permite unirse con gran avidéz a glicoconjugados presentes en la matriz extracelular o en las membranas celulares y formar así estructuras complejas denominadas como láctices. Al unirse a una gran variedad de glicoconjugados de superficie, las galectinas pueden promover la organización espacial de diferentes receptores, disparando cascadas de señalización transmembrana y modulando así diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis, angiogenesis y migración/invasión celular³³. Las galectinas no sólo son

secretadas al espacio extracelular (a través de una vía no convencional independiente del ER-Golgi⁶), sino que además se localizan en el núcleo, en el citoplasma y en las membranas celulares. Sus funciones intracelulares influyen también en mecanismos biológicos esenciales tales como corte y empalme de pre-ARNm, regulación del crecimiento celular, proliferación y apoptosis³⁰.

Las galectinas se clasifican en función de su estructura en tres grupos. Las galectinas prototipo (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15) son homodímeros que contienen solo un CRD por subunidad, las galectinas de tipo quimera (Gal-3) con un CRD C-terminal y un dominio N-terminal que contiene unidades repetitivas ricas en prolina y glicina, y las galectinas de repetición en tándem que contienen dos CRD en sus extremos N y C dentro de una subunidad (Gal-4, Gal-6, Gal-8, Gal-9 y Gal-12)^{30,31}.

- Funciones de las galectinas en el sistema inmune

Debido a la capacidad de las galectinas para modular las respuestas inmunológicas que se desencadenan contra varios tumores, se las ha propuesto como posibles mediadores de la resistencia a las terapias contra el cáncer, incluida la quimioterapia, la terapia anti-angiogénica y la inmunoterapia³²⁻³⁷.

Existen numerosas publicaciones que demuestran diversos roles de las galectinas en la modulación del sistema inmunológico y, en particular, en el control de las respuestas inmunes antitumorales^{32,35}. Por ejemplo, Gal-1 promueve programas inmunosupresores al inhibir la migración transendotelial de las células T CD4⁺ Th1 y Th17 y células T CD8⁺, tanto en los compartimentos periféricos como en las mucosas. Además, esta galectina ejerce funciones pro-apoptóticas sobre estos linfocitos³⁶. También actúa sobre otros tipos celulares controlando diversos procesos del sistema inmune. Estas acciones incluyen la diferenciación de Tregs, la inducción de un estado tolerogénico de las células dendríticas, y la polarización de macrófagos y microglia hacia un perfil inmunosupresor protumoral, entre otras^{6,32,35}.

Gal-3 muestra efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios, ya sea promoviendo o limitando las respuestas inmunes. La versatilidad y plasticidad de esta lectina se explica no sólo por su capacidad para modular una amplia variedad de receptores de superficie, sino también por su capacidad para ejercer diferentes funciones intracelulares. De hecho, la ubicación celular de Gal-3 en linfocitos define

si funcionará como un factor anti-apoptótico o pro-apoptótico. Como molécula pro-inflamatoria, Gal-3 extracelular favorece la activación de los neutrófilos y actúa como un quimioattractante de monocitos y macrófagos. Además, promueve la producción de superóxido y aumenta la activación de la microglia. Sin embargo, Gal-3 también puede funcionar como un regulador negativo de las respuestas inmunitarias, reprogramando los macrófagos hacia un fenotipo similar al M2, suprimiendo las funciones de las células T CD8⁺ y disminuyendo la cantidad de células dendríticas plasmocitoides circulantes⁶.

- Funciones de las galectinas fuera del sistema inmune

La expresión de Gal-1 en el microambiente tumoral favorece procesos tales como transformación celular, regulación de programas apoptóticos, control del ciclo celular, inducción de angiogénesis, invasión celular y metástasis³⁶. Hace algunos años, se han publicado trabajos en los que se evidencia la participación de Gal-1 en la angiogénesis³⁵. De hecho, se ha demostrado que en tumores resistentes a bevacizumab (un anticuerpo neutralizante anti-VEGF), esta lectina activa la vía de señalización del VEGFR2 de manera no canónica induciendo angiogénesis³⁷. Por otro lado, numerosos reportes atribuyen, al menos en parte, la participación de Gal-1 en el control de la adhesión, motilidad, migración e invasión de distintos tipos celulares a su capacidad para modular interacciones célula-célula y célula-matriz, regular la expresión y la actividad de distintos receptores de membrana y controlar la expresión de metaloproteinasas de matriz^{38,39,40}.

En cuanto a Gal-3, se ha demostrado que ésta participa en múltiples procesos biológicos tales como la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el corte y empalme del ARN y la migración celular⁴¹. Además, en el espacio intracelular, Gal-3 puede unirse a sustratos mediante interacciones proteína-proteína como ocurre con el factor anti -apoptótico Bcl-2 para inhibir la apoptosis⁴². En células de melanoma, esta galectina favorece la migración e invasión celular al controlar los niveles de expresión de la metaloproteinasa MMP-1⁴³. Además, en líneas celulares de cáncer de páncreas, su silenciamiento genera un marcado descenso de la migración y de la capacidad invasiva sin afectar significativamente la proliferación. En este caso, Gal-3 favorecería el fenotipo invasor al promover la expresión de MMP-2⁴⁴.

- Galectinas en gliomas

A nivel histológico, el GBM se caracteriza por la presencia de hiperplasia microvascular y zonas con necrosis en “empalizada”. Actualmente, se reconoce que en estas regiones existe una hipoxia severa y que sus células sobre-expresan HIF1 α y secretan factores pro-angiogénicos como VEGF e IL-8⁴⁵. Estas características, sumadas a la elevada capacidad proliferativa y a la marcada radio- y quimio-resistencia, ofrecen una explicación para la elevada agresividad de estos tumores. Debido a que las galectinas poseen funciones reconocidas en la regulación de todos estos procesos, el estudio del rol que juega esta familia proteica en la biología de los gliomas de alto grado podría brindar información valiosa que facilite el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas.

En astrocitomas, distintos trabajos han establecido la existencia de una correlación positiva entre los niveles de expresión de Gal-1 y el grado de malignidad de estos tumores⁴⁶⁻⁴⁸. Un análisis realizado en un panel de líneas celulares de glioma reveló que las galectinas con mayores niveles de expresión corresponden a las galectinas -1, -3 y -8. La expresión de galectina-2 fue detectada sólo en una línea celular, mientras que las galectinas -4 y -9 mostraron baja expresión en tres de las ocho líneas estudiadas⁴⁹. En un trabajo basado en xenotrasplantes ortotópicos de líneas celulares de GBM, se demostró que los niveles de expresión de las galectinas -1, -3 y -8 eran mayores en las regiones invasivas de los tumores. Asimismo, en ensayos *in vitro* se observó que el agregado exógeno de galectinas -1 y -3, y en menor medida de galectina-8, fue capaz de estimular la migración de distintas líneas celulares⁵⁰. Trabajos posteriores orientados al estudio de Gal-1 confirmaron estos resultados y reforzaron la idea de que esta galectina cumple importantes funciones en la migración y en la capacidad invasiva de células de glioma^{51,52}. En cuanto a la supervivencia celular y la resistencia a drogas, en líneas celulares comerciales se ha reportado que tanto la radiación ionizante como el tratamiento con TMZ inducen la expresión de Gal-1 y que ésta confiere una mayor resistencia frente a tratamientos con TMZ^{53,54}.

En cuanto a Gal-3, se ha identificado una fuerte correlación entre su expresión y el potencial maligno de los tumores del SNC. Curiosamente, esta lectina de tipo quimera se ha propuesto como una herramienta para distinguir distintos tipos de tumores del SNC⁶. El papel de la Gal-3 en la migración e invasión del GBM no es tan claro, aunque existe evidencia que esta galectina también favorece la invasión local de los gliomas.

En las células no tumorales del cerebro, los niveles más altos de esta lectina se encuentran en los vasos sanguíneos, seguidos del tejido de la materia blanca y la materia gris. Este resultado es de interés, ya que el GBM utiliza las vías perivasculares y de la materia blanca para la migración. Al igual que con Gal-1, los niveles de expresión de Gal-3 son más altos en las secciones más invasivas del tumor y las células asociadas con los vasos periféricos. Por otra parte, existen evidencias que indican que Gal-3 cumple funciones protectoras en condiciones de privación de nutrientes y de hipoxia⁵⁶.

- Galectina-1 y Galectina-3 en células madre de glioblastoma:
Resultados previos del laboratorio

Previamente, en nuestro laboratorio se determinó que dentro de las galectinas humanas, sólo las galectinas -1, -2, -3, -8 y -9 mostraron niveles de expresión significativos de ARNm en las distintas líneas de CMG analizadas, las cuales se denominan G01, G02, G03, G08 y G09 (Figura 5). Notablemente, las líneas de CMG expresan mayores niveles de los transcritos de Gal-1 y Gal-3 que los observados en progenitores neurales (NP), los cuales fueron utilizados como control no tumoral (Figura 5B). Mediante ensayos de Western blot e inmunofluorescencia se evaluó también la abundancia proteica de Gal-1 y Gal-3 y su localización celular. Se pudo determinar que existe una correlación entre los niveles de expresión de los ARNm y los respectivos productos proteicos, y que estas proteínas muestran una localización principalmente citoplasmática (Figura 6).

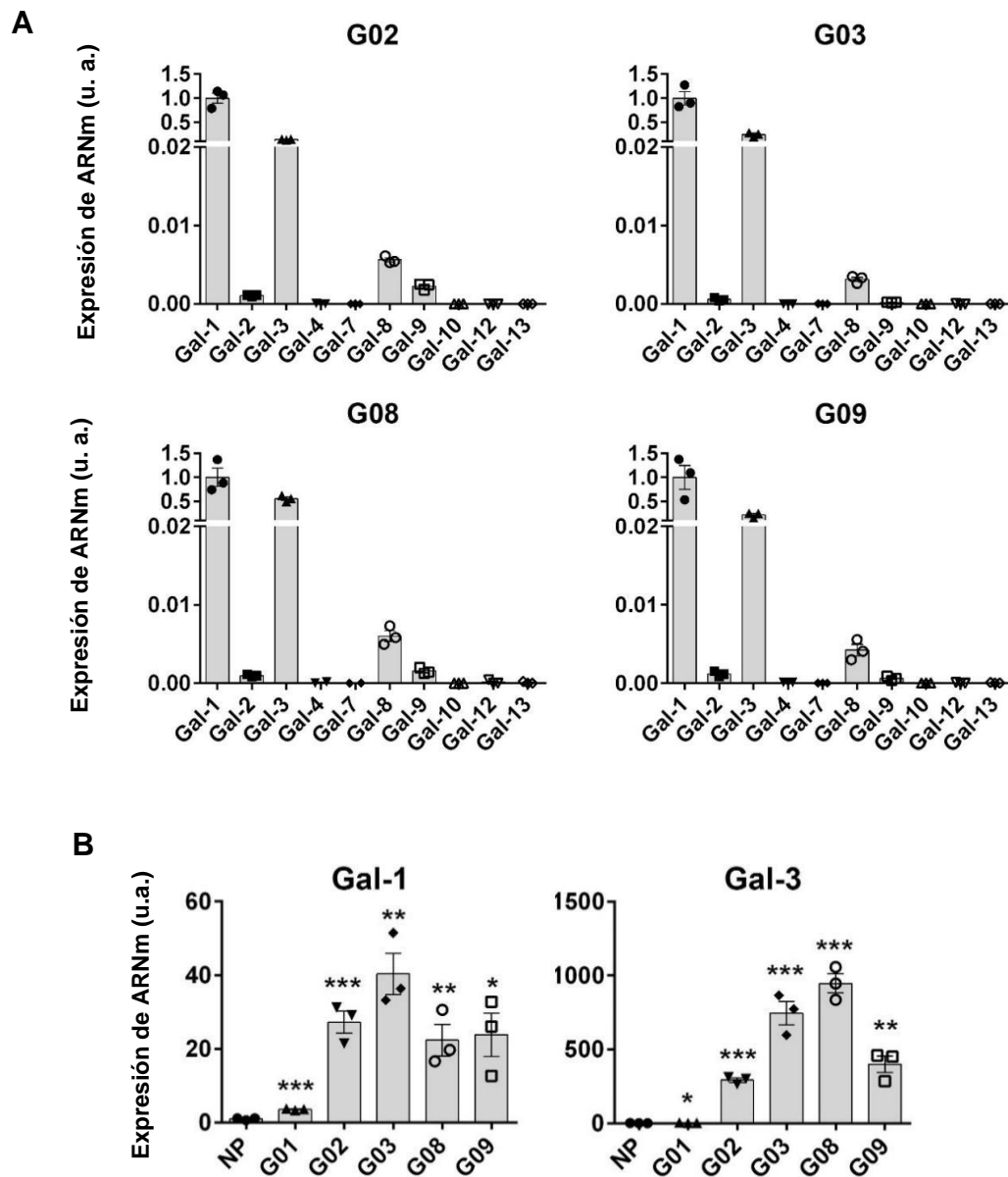


Figura 5. (A) Expresión de ARNm de galectinas humanas mediante RT-qPCR en tiempo real en líneas de CMG (G02, G03, G08 y G09). Los valores fueron normalizados contra RPL7. Los resultados se expresan como valores relativos al nivel de expresión de Gal-1. **(B)** Niveles de expresión de transcritos de las galectinas -1 y -3 mediante RT-qPCR en neuroprogenitores no tumorales (NP) y líneas de CMG. Los valores fueron normalizados contra RPL7. Los resultados se expresan como valores relativos al nivel de expresión de Gal-1. En todos los casos se realizó una prueba *t* de Student para evaluar diferencias significativas entre la expresión de transcritos de Gal-1 y Gal-3 en NP y cada línea de CMG. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

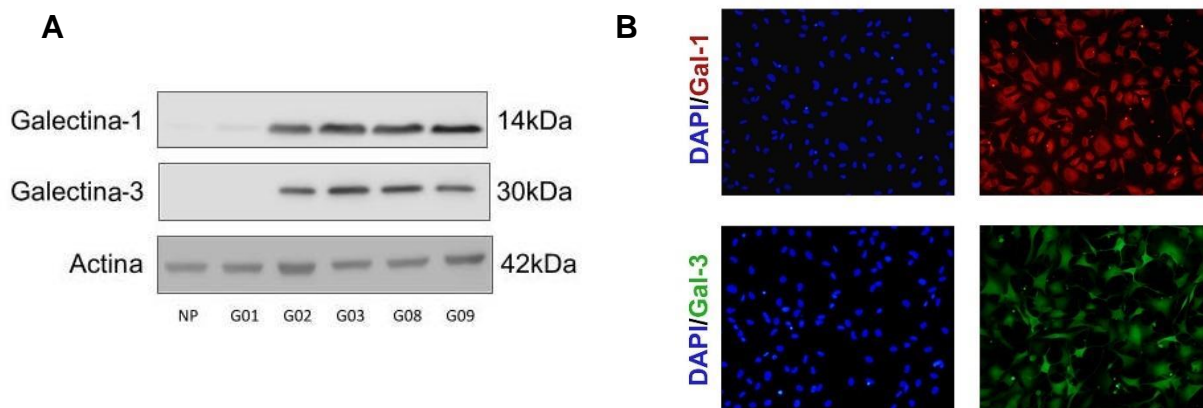
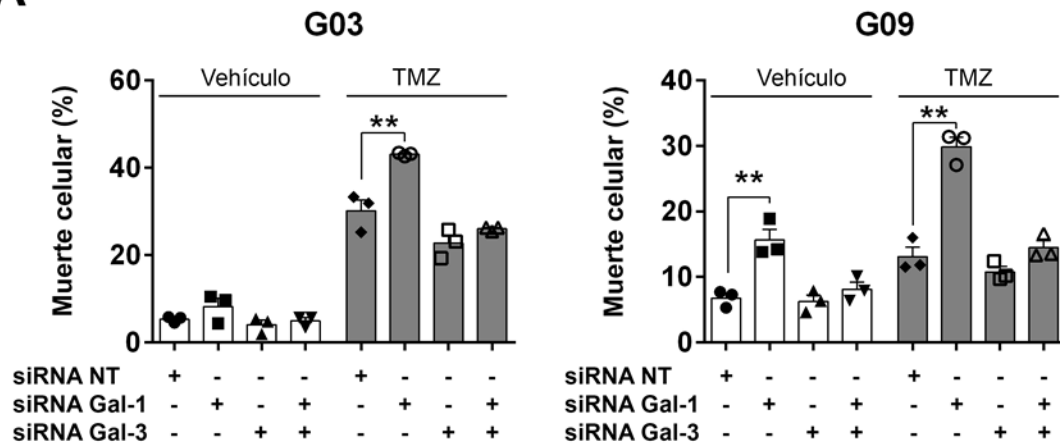


Figura 6. Expresión y localización de Gal-1 y Gal-3 en líneas de CMG (A) Determinación de los niveles proteicos de Gal-1 y Gal-3 en distintas líneas de CMG y en NP mediante Western blot. Los niveles de expresión de actina fueron utilizados como controles de carga. (B) Inmunomarcaciones de Gal-1 y Gal-3 analizadas mediante microscopía de fluorescencia en la línea de CMG G09. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Magnificación: 200X.

En el laboratorio, también se evaluó el papel de Gal-1 y Gal-3 en la viabilidad de las CMG. Para ello, las células fueron transfectadas con ARN pequeños de interferencia (siRNAs) específicos para Gal-1 y/o Gal-3, tanto en presencia como en ausencia de TMZ. Mediante el análisis de células teñidas con ioduro de propidio (IP) como indicador de muerte celular, se determinó que el silenciamiento de Gal-1 conlleva un aumento significativo de la muerte celular, tanto en ausencia como en presencia de TMZ. El silenciamiento de Gal-3 en cambio, no produjo cambios en la viabilidad de estas células. Llamativamente, el silenciamiento concomitante de Gal-1 y Gal-3 no afectó la viabilidad celular en ningún caso, es decir, el silenciamiento dual de estas galectinas revirtió el aumento de la muerte celular causada por el silenciamiento de Gal-1 (Figura 7). **Esto podría estar indicando que los efectos anti-apoptóticos de Gal-1 dependen de la expresión de Gal-3.** Por último, se observó una estrecha correlación entre la muerte celular y la actividad de caspasa-3, lo cual implica que los cambios en la viabilidad celular observados se deben a cambios en la apoptosis.

A



B

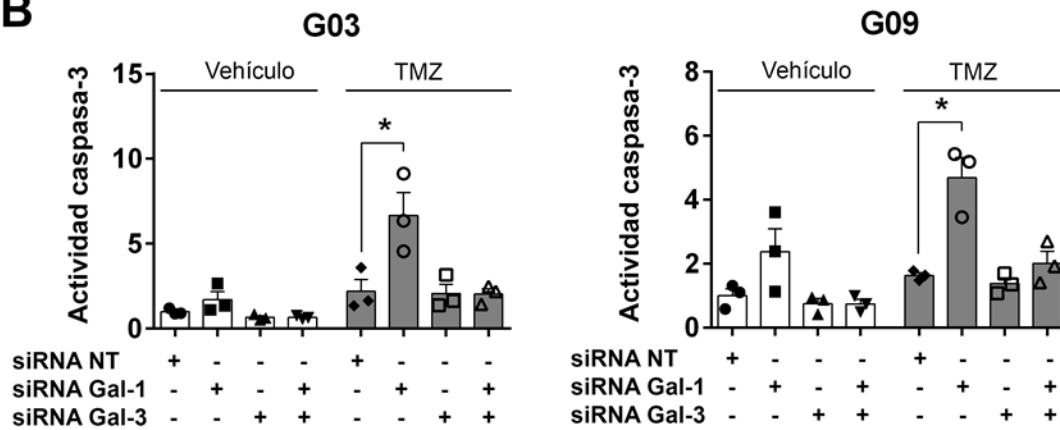


Figura 7. Efecto de los niveles de expresión de Gal-1 y Gal-3 sobre la viabilidad de CMG (G03 y G09), en ausencia y presencia de TMZ. **(A)** Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células muertas marcadas con Ioduro de propidio (IP⁺) luego de silenciar o no Gal-1, Gal-3 o ambas de manera simultánea. Los gráficos de barras muestran la media \pm E.S. de tres experimentos. Se realizó la prueba *t* de Student para detectar diferencias significativas. ***P* < 0.01. **(B)** La actividad de caspasa-3 en lisados de líneas celulares G03 y G09 fue determinada mediante ensayos fluorométricos luego de realizar los silenciamientos correspondientes. El gráfico muestra el cambio en la actividad de caspasa-3 en relación a la de células no tratadas (control, siRNA NT). Los gráficos de barras muestran la media \pm E.S. de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba *t* de Student para detectar diferencias significativas. **P* < 0,05.

Objetivos e hipótesis

Como las CMT muestran una elevada quimio-resistencia^{57,58}, controlada en parte por los niveles de expresión de Gal-1 y Gal-3, planteamos como hipótesis de trabajo que drogas como TMZ, CCNU, VCR y PCB pueden inducir cambios en la expresión de dichas lectinas y que esto, en consecuencia, conlleva cambios en la sensibilidad al silenciamiento de las mismas. En otras palabras, proponemos que los agentes quimioterapéuticos, al modificar la expresión de Gal-1 y Gal-3, impactan en la viabilidad dependiente de estas lectinas.

Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos como objetivo estudiar cómo diferentes agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan los niveles de expresión de Gal-1 y Gal-3 en CMG derivadas de pacientes y de qué manera esto a su vez influye en la viabilidad de estas células. A partir de este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de TMZ, PCB, VCR y CCNU sobre los niveles de expresión y secreción de Gal-1 y Gal-3 en 2 líneas de CMG derivadas de pacientes. La expresión de estas lectinas será evaluada mediante técnicas de RT-qPCR, Western blot y ensayos de ELISA.
- 2) Determinar el impacto del silenciamiento de Gal-1 y/o Gal-3 en la viabilidad de dos líneas de CMG derivadas de pacientes. Luego de silenciarlas o no a estas células, se analizará el porcentaje de muerte celular, tanto en presencia como en ausencia de agentes quimioterapéuticos.

Materiales y métodos

- Cultivo *in vitro* de líneas celulares

En este trabajo se utilizaron 2 líneas de CMT de GBM derivadas de biopsias que fueron aisladas, establecidas y caracterizadas previamente en el Laboratorio de Investigación Aplicada a las Neurociencias (LIAN) de la Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)¹³.

Para llevar a cabo cada uno de los objetivos, dichas líneas celulares fueron cultivadas en un medio de cultivo definido, libre de suero, denominado TSM^{13,20}. Este está compuesto por el medio basal Neurobasal, los suplementos B27 y N2, los factores de crecimiento EGF 20 ng/mL y bFGF 20 ng/mL, Piruvato de Sodio 100 mM, Glucosa 6 g/L, Penicilina-Streptomina 5 mg/mL, aminoácidos no esenciales 2 mM y L-Glutamina 0,2 mM. Todos los insumos fueron obtenidos en Thermo. Para favorecer la adhesión celular y permitir el crecimiento en monocapa, se realizaron pre-tratamientos de las placas de cultivo con *Geltrex* (Thermo) como matriz extracelular. Para la expansión de las líneas celulares, los pasajes de células se realizaron cuando los cultivos alcanzaron una confluencia cercana al 100%. Esto se realizó aspirando el medio de cultivo, lavando con PBS e incubando las células con la enzima *StemPro Accutase* (Thermo) durante 3-5 minutos a 37°C. Luego de la incubación, la enzima se diluye en PBS 1:5 y la suspensión celular es centrifugada por 5 minutos a 200 x g. El pellet celular se resuspende en TSM y las células son transferidas a nuevas placas pre-tratadas con *Geltrex*.

Para la criopreservación de las líneas celulares, éstas fueron disociadas con *StemPro Accutase*, pero tras la centrifugación se resuspendieron en medio TSM conteniendo DMSO 10% v/v y luego fueron almacenadas en criotubos. Estos se colocaron en un contenedor con isopropanol en un freezer a -80°C por 24 hs (para lograr un congelamiento lento) y luego fueron guardados en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelamiento, los viales fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido y colocados en un baño termostático a 37°C. Una vez descongeladas, las células fueron transferidas inmediatamente a un tubo cónico conteniendo 10 ml de PBS y centrifugadas por 5 minutos a 200 x g.

Tras descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en TSM y colocadas en placas pre-tratadas con *Geltrex*.

- Tratamientos con agentes quimioterapéuticos

Todos los agentes quimioterapéuticos fueron obtenidos en Sigma. TMZ, CCNU y PCB fueron resuspendidos en DMSO, mientras que VCR fue resuspendida en agua.

Las concentraciones de las drogas se definieron según referencias bibliográficas^{14,59,60,61} y recomendaciones del Departamento de Neurooncología de FLENI, intentando utilizar concentraciones similares a las que están expuestas las células tumorales en los pacientes. Dichas concentraciones se indican en la Tabla 2.

Droga	Concentración utilizada (µM)
TMZ	200
PCB	140
VCR	0,12
CCNU	20

Tabla 2. Concentración utilizada para cada droga.

- Extracción de ARN total

Se sembraron 5×10^5 células por pocillo en 5 pocillos de placas Multiwell de 6 pocillos y a las 24 hs se realizaron los tratamientos con las drogas. A las 72 hs las células fueron lisadas con el reactivo *Trizol* (Thermo) durante 10 minutos y luego se agregó cloroformo (Merck) en una relación 1:5 con el trizol, incubando por 3 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación durante 15 minutos a 4°C y 12.000 g, se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol (Merck). Luego de centrifugar durante 10 minutos a 4°C y 12.000 g, se lavó el pellet con etanol 75% y se realizó una nueva centrifugación durante 5 minutos a 4°C y 7.500 g. El pellet se resuspendió en agua desionizada y la concentración de ARN

(ng/ μ L) se determinó utilizando el espectrofotómetro automático NanoDrop 2000 y el software ND-2000. Se emplearon las muestras cuyos índices OD260/280 fueron mayores a 1,8.

- Retrotranscripción

Para efectuar la retro-transcripción se utilizaron 500 ng de ARN total por muestra, a los cuales se les agregaron 10 ng/ml de oligonucleótidos con secuencias al azar (*random primers*) (Thermo) y dNTPs 1 mM (Thermo). Se completó el volumen final de reacción a 15 μ L con agua desionizada libre de RNAsas y luego se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 5 minutos en termocicladora. Para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo por al menos un minuto.

Finalmente, en cada tubo se agregaron 200 U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega), la cual fue disuelta en buffer adecuado (provisto por el fabricante).

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en termocicladora utilizando el siguiente programa:

1. *Apareamiento (annealing)* de *random primers* con el templado: 5 minutos a 25°C.
2. Retrotranscripción del ARN: 60 minutos a 37°C.
3. Inactivación de la enzima MMLV: 15 minutos a 70°C.

Al finalizar la reacción, las muestras de ADNc fueron diluidas 1/5 utilizando agua desionizada libre de RNAsas y almacenadas a - 20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

- PCR en tiempo real

Los cebadores (*primers*) utilizados para la qPCR fueron diseñados con el programa *Beacon Designer* (Premier Biosoft international), definiendo como T_m a una temperatura de 60°C. Para evitar la amplificación espuria de ADN genómico, los *primers* fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y

anti-sentido fuese complementario a secuencias presentes en exones diferentes del gen blanco. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 3.

GEN BLANCO	SENTIDO (5' →3')	ANTI-SENTIDO (5' →3')
GUSB	CCGCAGTTCTTCAACAAC	ACCATCTTCAAGTAGTAGCC
Gal-1	ACATCCTCCTGGACTCAATC	AGGTTGTTGCTGTCTTTGC
Gal-3	CTGATTGTGCCTTATAACCTG	ATGACTCTCCTGTTGTTCTC

Tabla 3. Secuencias de *primers* utilizadas para RT-PCR en tiempo real.

Cada reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un volumen total de 20 µL, compuestos por 10 µL del SYBR-Green master mix (Thermo); 3,6 µL del primer sentido (5 µM); 3,6 µL del primer anti- sentido (5 µM); 0,8 µL de agua y 2 µL del ADNc. Se utilizó el termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems). Cada muestra fue analizada por duplicado y en todos los casos el programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 95°C.
2. Apareamiento y extensión: 30 segundos a 60°C.
3. Desnaturalización: 40 segundos a 95°C.
4. 40 ciclos de repetición de los pasos 2 y 3.
5. Curva de temperatura de apareamiento.

El protocolo de curva de temperatura de apareamiento permitió evaluar la presencia de un único producto de amplificación. Para el análisis de los datos se utilizó el método del $\Delta\Delta C_t$ utilizando el gen GUSB como *housekeeping* para el control de carga.

- Análisis de expresión proteica por Western Blot

Preparación del lisado celular: Se cultivaron 1×10^6 células en placas de 60 mm y a las 48 hs se realizaron los tratamientos con las drogas. A las 72 hs se levantaron las células aspirando el medio de cultivo, lavando con PBS e incubando las células

con la enzima *StemPro Accutase* (Thermo) durante 5 minutos a 37°C. Luego de la incubación, la enzima se diluyó en PBS 1:5 y la suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 200 x g. El pellet celular se resuspendió en PBS y nuevamente se centrifugó durante 90 segundos a máxima velocidad. Finalmente el pellet se resuspendió en RIPA buffer (20 mM Tris HCl pH=7,4, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS), 0,5% deoxicolato de sodio y 1 % tritón X100) conteniendo inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail set I*, Calbiochem, San Diego, CA, USA) y se incubó 15 minutos en hielo.

Cuantificación y desnaturalización de proteínas: Se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo), empleando albúmina sérica bovina como patrón. Para realizar la curva se utilizaron 5 concentraciones de albúmina sérica bovina: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL y 0,125 mg/mL; más un blanco utilizando agua.

En una placa Multiwell de 96 pocillos se colocaron 200 µL de la mezcla de reactivos del kit en todos los pocillos a utilizar, 10 µL de cada concentración de albúmina en los pocillos para la curva y 7,5 µL de agua junto con 2,5 µL de las muestras en los pocillos a cuantificar. Se incubó durante 1 hora en estufa a 37° tapando con papel aluminio y se leyó la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro de placas Bio-Rad iMarc™ Microplate Reader.

Para la desnaturalización, se colocaron los volúmenes de muestra necesarios para obtener 30 µg de proteínas y fueron mezclados con 8 µL de una solución desnaturalizante 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2 %, Azul bromofenol 0,3%, β-mercaptoetanol) 0,28 M), llevando a un volumen final de 40 µL con agua, y finalmente se incubó a 100°C durante 5 minutos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida: Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los geles separadores se prepararon al 15% para Gal1 (2 mL de agua destilada estéril, 4,5 mL de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,5, 90 µL de SDS 10%, 90 µL de persulfato de amonio 10% y 9 µL de TEMED para 6 mL de solución) y al 12% para Gal3 (2,9 mL de agua destilada estéril, 3,6 mL de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,5, 90 µL de SDS 10%, 90 µL de persulfato de amonio 10% y 9 µL de TEMED para 6 mL de

solución). Los geles concentradores se prepararon al 4% (2,17 mL de agua destilada estéril, 0,4 mL de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,375 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 12 µL de persulfato de amonio 25% y 2 µL de TEMED para 3 mL de solución). Se sembraron aproximadamente 40 µg de lisado proteico por calle, y la electroforesis se realizó a 100 V en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%).

Transferencia y revelado: Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (General Electric) durante 45 minutos a 10V. Luego, estas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en solución PBS-Tween con 5% m/v de leche descremada para bloquear los sitios inespecíficos. Al finalizar el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (Tabla 4), preparados en PBS-Tween con 3% de leche descremada. Al día siguiente se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 2 lavados de 20 minutos en PBS-Tween. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (acoplados a la enzima peroxidasa) (Tabla 5), diluidos en la misma solución que se empleó para aplicar el anticuerpo primario. Por último, se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 2 lavados de 20 minutos con PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial *Super Signal West Femto* (Thermo) y dicha reacción fue captada por el detector ImageQuant LAS 4000mini.

Anticuerpo	Empresa	N° de catálogo	Origen	Dilución
Anti-Gal1	Laboratorio de Glicomedicina. IBYME-CONICET	-	Conejo	1/3000
Anti-Gal3	Cell Signaling Technology	87985	Conejo	1/3000
Anti-GAPDH	Santa Cruz BT	sc-365062	Ratón	1/3000

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.

Anticuerpo	Empresa	N° de catálogo	Origen	Dilución
Anti-Ratón	Abcam	ab205719	Cabra	1/5000
Anti-Conejo	Abcam	ab97200	Cabra	1/20000

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot.

- Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Se cultivaron 3×10^5 células por pocillo en 5 pocillos de placas Multiwell de 12 pocillos y a las 48hs se realizaron los tratamientos con las drogas. A las 72 hs se realizó un cambio de medio y un nuevo agregado de drogas, y a las 24 hs se tomaron los medios condicionados correspondientes. Se realizaron dos centrifugaciones para eliminar células muertas y debris celulares, respectivamente, y luego se realizaron diluciones de los sobrenadantes asegurando una correcta medición (dentro del rango de la curva estándar). Dado que los agentes quimioterapéuticos empleados afectan de manera variable la proliferación de las CMG, luego de recolectar los sobrenadantes, las células fueron disociadas con *StemPro Accutase*, transferidas a tubos cónicos y cuantificadas utilizando Azul Tripán y cámara de Neubauer. El número final de células por pocillo se utilizó para normalizar los resultados.

Se utilizaron los kits *Human Galectin-1 y Human Galectin-3 Quantikine ELISA Kits* (DGAL10 y DGAL30) (R&D Systems, Biotechned). El método se realizó siguiendo las pautas del fabricante: se agregaron 100 μ L de diluyente de ensayo RD1-9 a cada pocillo, luego 100 μ L de estándar (para el cual se realizó una curva con diluciones seriadas al medio) o de los medios según corresponda. Se incubó dos horas a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con Wash Buffer y se colocaron 200 μ L de anticuerpos conjugados con peroxidasa (Anti-Gal1 o Anti-Gal3 según corresponda). Se incubó dos horas a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con Wash Buffer y se colocaron 200 μ L de solución sustrato en cada pocillo. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz y se colocaron 50 μ L de solución *Stop*. Una vez que el color de los pocillos viró del azul al amarillo se midió la absorbancia a 450 nm y a 540 nm (este último será restado

para corregir las imperfecciones ópticas de la placa) en el espectrofotómetro de placas Bio-Rad iMarc™ Microplate Reader.

Finalmente, se graficó la curva estándar para obtener la ecuación de la recta y realizar los cálculos de las muestras.

- Silenciamiento génico

Para silenciar la expresión de manera transitoria de Gal-1 y/o Gal-3, las células fueron transfectadas utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNAs). Para ello, se utilizó lipofectamina RNAiMAX (Thermo) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante: las células fueron sembradas en una confluencia cercana al 50% y luego fueron incubadas con los complejos siRNA-lipofectamina (preparados en concentraciones tales que la concentración final sobre las células sea: siRNA 10 pmol/ml; lipofectamina 3 μ L/mL). Para permitir la formación de estos complejos, en un pocillo se preparó primero una solución 20X de siRNAs en el medio basal (Neurobasal) y en otro, una solución 20X de lipofectamina, también en medio basal. Se mezcló el contenido de ambos pocillos, se incubó durante 5 minutos para que se formen los complejos correspondientes, y luego los complejos fueron agregados a los pocillos que contenían las células (logrando una dilución 1/20 de los complejos en medio TSM). Las células se incubaron en presencia de los complejos a 37°C durante 5 horas, tras las cuales el medio fue cambiado. Todos los tratamientos fueron realizados 24 horas post-transfección y tuvieron una duración de 72 hs adicionales. En la Tabla 6 se indican los siRNAs utilizados.

siRNA	Código de Secuencia	Empresa (Producto)
NT (<i>Non-targeting</i>)	cat #4390846	Thermo Fisher Scientific
Anti-Gal1	cat #4390824 ID s194592	Thermo Fisher Scientific
Anti-Gal3	cat #4392420 ID s8148	Thermo Fisher Scientific

Tabla 6. Números de catálogo y Códigos de identificación de los siRNAs utilizados.

- Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron $1,25 \times 10^5$ células por pocillo en 5 pocillos de placas Multiwell de 12 pocillos, a las 24hs se realizaron los silenciamientos y luego de 24 hs adicionales se realizaron los tratamientos con los agentes quimioterapéuticos correspondientes. A las 72 hs, con el fin de no excluir del análisis a las células muertas que estén en suspensión, se tomaron tanto los medios como las células adheridas (lavando con PBS e incubando con la enzima *StemPro Accutase* durante 5 minutos a 37°C). Luego de la incubación, la suspensión celular (que incluye las células en suspensión del sobrenadante y las adheridas) se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm.

El pellet celular se resuspendió en una solución de PBS con Ioduro de Propidio (IP) (Dilución 1:100 del IP 1 mg/ml), se colocaron las muestras en hielo y se pasaron por el citómetro Accuri C6 (Becton Dickinson), excitando a 488 nm para medir la fluorescencia emitida por las células muertas que incorporaron el IP. Los datos fueron analizados utilizando el programa *BD Accuri C6 software*.

- Análisis estadístico

Las significancias de las diferencias observadas fueron analizadas mediante análisis estadísticos aplicando el test *t de Student* utilizando el software GraphPad PRISM versión 6.

Resultados

- Heterogeneidad de las células madre de glioma derivadas de pacientes

En la Figura 8 se presentan fotomicrografías de contraste de fases mostrando la morfología de las 2 líneas de CMT (G03 y G09), que fueron utilizadas en este trabajo. Para mantener su estado indiferenciado (Figura 8, panel izquierdo), estas células se cultivan en el medio TSM descrito previamente en materiales y métodos. Es llamativo que este tipo de células muestran morfologías características, lo cual refleja la heterogeneidad inter-tumoral de los GBM. Esta variabilidad entre las diferentes líneas de CMG también se observa en otros aspectos del cultivo, como, por ejemplo, en el tiempo de duplicación y en la adherencia celular. Para inducir la diferenciación de estas células, es necesario que el medio TSM no contenga los factores EGF y bFGF. Utilizando este medio deprivado de factores de crecimiento durante 14-21 días, las células alcanzan un fenotipo diferenciado. En la Figura 8 (panel derecho), se puede observar la morfología de las células diferenciadas. En el caso de la línea G03, la diferenciación conlleva la aparición de células alargadas que presentan el citoplasma agrandado, característico de un fenotipo mesenquimal. Por su parte, la línea G09 se diferencia dando lugar a dos subpoblaciones diferentes, una formada por células que exhiben una apariencia estrellada con múltiples prolongaciones compatible con un fenotipo astrogial, y otra constituida por células pequeñas que poseen un fenotipo neuronal.

Estas observaciones nos permitieron confirmar la identidad de estas líneas de CMG, ya que ambas habían sido caracterizadas previamente¹³.

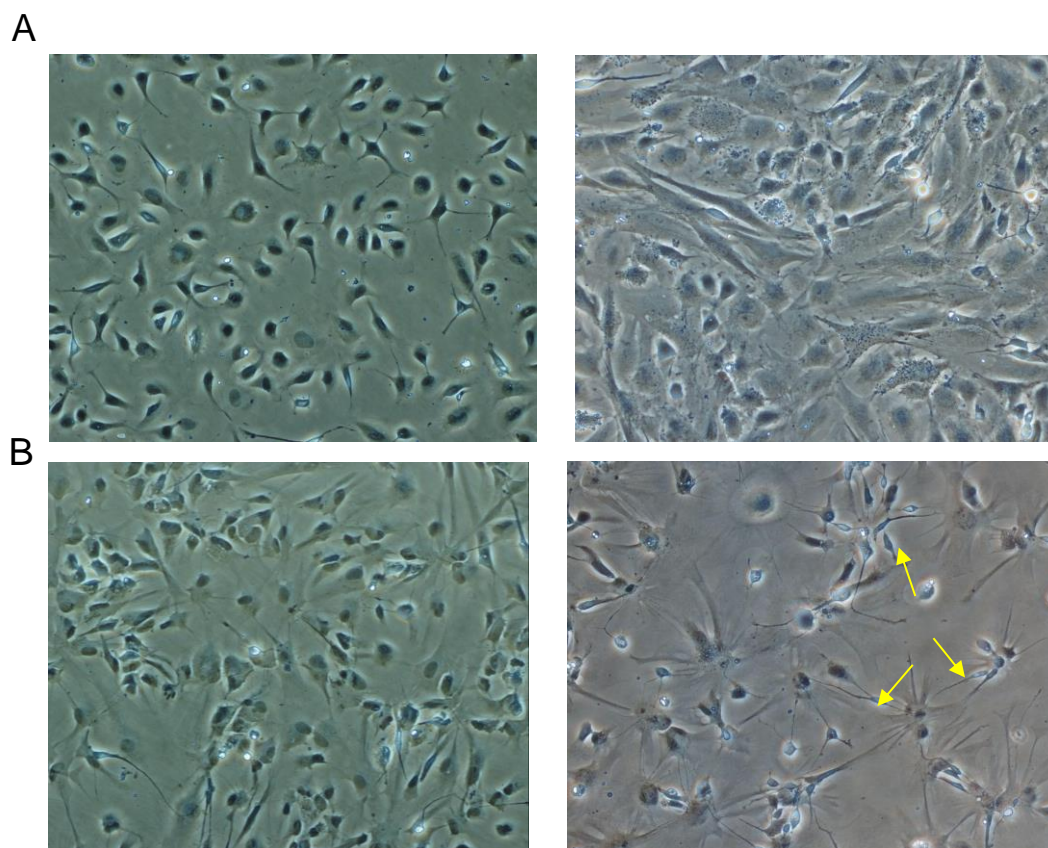


Figura 8. Fotomicrografías de contraste de fases en las que se observan las morfologías de las líneas de CMG utilizadas en este trabajo (A-G03, B-G09), cultivadas en presencia de bFGF y EGF para mantener el estado indiferenciado (panel izquierdo) y en ausencia de estos factores de crecimiento durante 21 días para inducir la diferenciación (panel derecho). Las flechas en las fotomicrografías de G09 (panel derecho) indican células con morfología neuronal.

- Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan diferencialmente la expresión de los transcritos de Gal-1 y Gal-3 en CMG

En primera instancia, determinamos los niveles de expresión de los ARNm de Gal-1 y Gal-3 mediante RT-qPCR en las líneas G03 y G09, tratadas o no con los agentes quimioterapéuticos TMZ (200 μ M), PCB (140 μ M), VCR (0,12 μ M) y CCNU (20 μ M) durante 72 hs. Los resultados revelaron que en la línea G03, el tratamiento con TMZ conllevó una disminución leve pero significativa de los niveles de los ARNm de Gal-1 y Gal-3, mientras que la exposición a VCR causó una clara inducción del transcrito de Gal-1, pero no de Gal-3 (Figura 9 panel superior). Con respecto a la línea G09, al

igual que en la línea G03, el tratamiento con TMZ causó una disminución de los niveles del ARNm de Gal-1, aunque luego de este tratamiento no se observaron cambios de expresión de los transcritos de Gal-3. Por su parte, el tratamiento con VCR también produjo un aumento significativo de Gal-1 pero no de Gal-3 (Figura 9 panel inferior). Por último, la exposición de las líneas G03 y G09 a PCB o CCNU no modificó los niveles de expresión de los transcritos de ninguna de estas lectinas. En resumen, los únicos tratamientos que causaron cambios significativos en la expresión del ARNm de estas galectinas fueron el de TMZ (significativo tanto para Gal-1 como para Gal-3) y el de VCR (significativo sólo para Gal-1) (Figura 9).

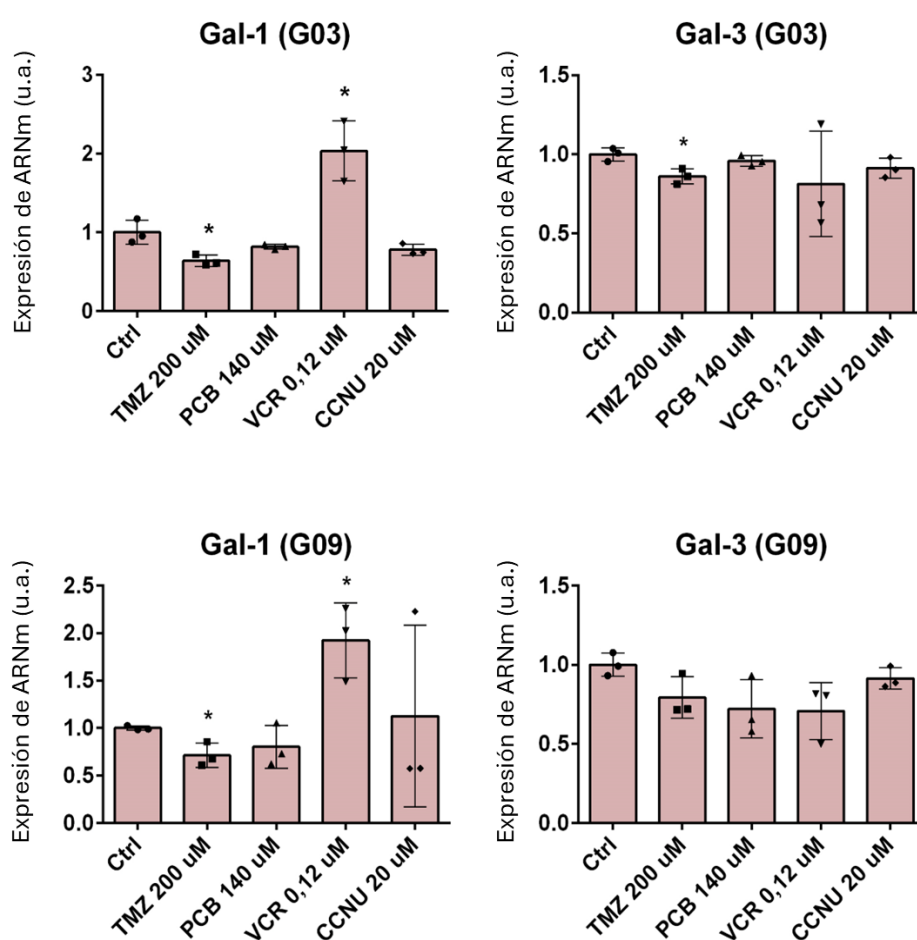


Figura 9. Niveles de expresión de los transcritos de Gal-1 y Gal-3 en las líneas celulares G03 y G09. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para Gal-1 y Gal-3. Los valores fueron normalizados contra los niveles de expresión de GUSB. Todos los valores son relativos a la expresión de células sin tratar, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. En todos los casos se realizó una prueba *t* de Student para evaluar diferencias significativas entre la expresión de transcritos de Gal-1 y Gal-3 en células no tratadas y tratadas con los respectivos agentes quimioterapéuticos (* $P < 0,05$).

- Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico incrementan levemente los niveles proteicos de Gal-1 en CMG

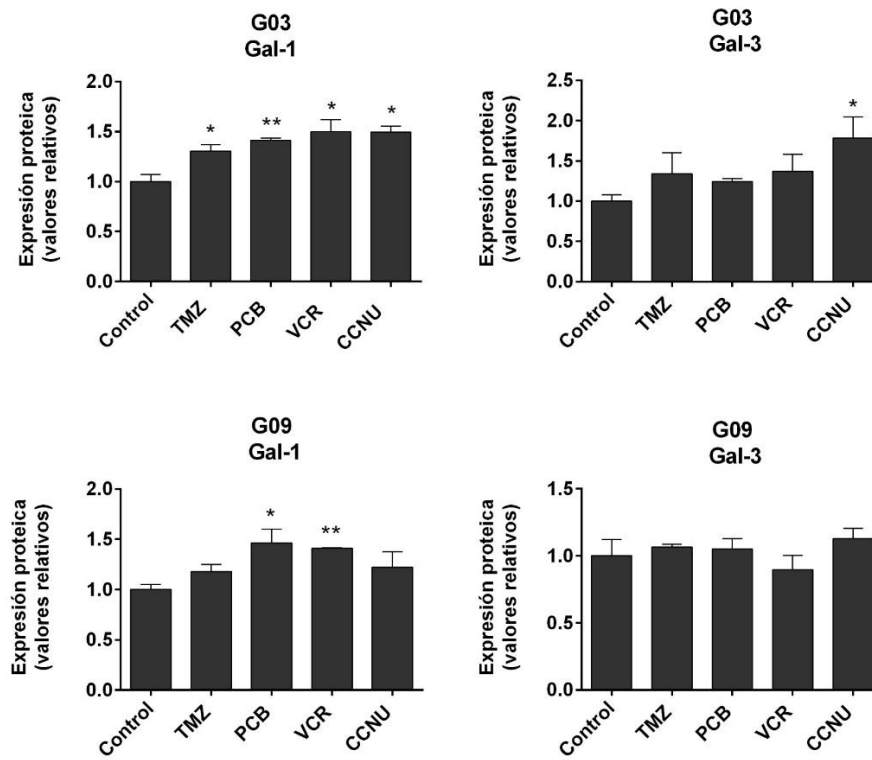
Al analizar los niveles proteicos de estas lectinas mediante ensayos de Western blot (en los que no se incluye la fracción secretada en el medio de cultivo), pudimos observar que los tratamientos con TMZ, PCB, VCR y CCNU produjeron aumentos leves en los niveles de Gal-1 (aunque en algunos casos, como en los tratamientos con TMZ y CCNU en la línea G09, no hubo cambios significativos). Con respecto a la expresión de Gal-3 no se observaron cambios en los niveles proteicos, excepto luego del tratamiento con CCNU en la línea G03, en donde se observó un incremento significativo de esta lectina (Figura 10 A).

Para una correcta interpretación de los resultados, como controles positivos (C+) de Gal-1 y Gal-3 empleamos lisados de la línea celular monocítica de leucemia humana THP-1. Como controles negativos (C-) de Gal-1 y Gal-3 empleamos lisados de las líneas celulares 293T (células humanas de riñón) y LNCaP (células humanas de cáncer de próstata) respectivamente, dado que las mismas no expresan constitutivamente estas lectinas (Figura 10 B, panel superior).

- Los tratamientos con agentes quimioterapéuticos de uso clínico afectan diferencialmente la secreción de Gal-1 y Gal-3 en CMG

Dado que las galectinas secretadas por las células tumorales contribuyen al microambiente y favorecen la progresión tumoral (mediante mecanismos pro-angiogénicos e inmunosupresores entre otros), decidimos analizar las concentraciones de estas lectinas en los sobrenadantes celulares. Mediante ensayos de ELISA en ambas líneas de CMG pudimos determinar que todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con PCB, producen un aumento de la abundancia de Gal-1 soluble. Con respecto a las concentraciones de Gal-3 secretada, sólo se observaron aumentos significativos luego de los tratamientos con TMZ y CCNU (Figura 11).

A



B

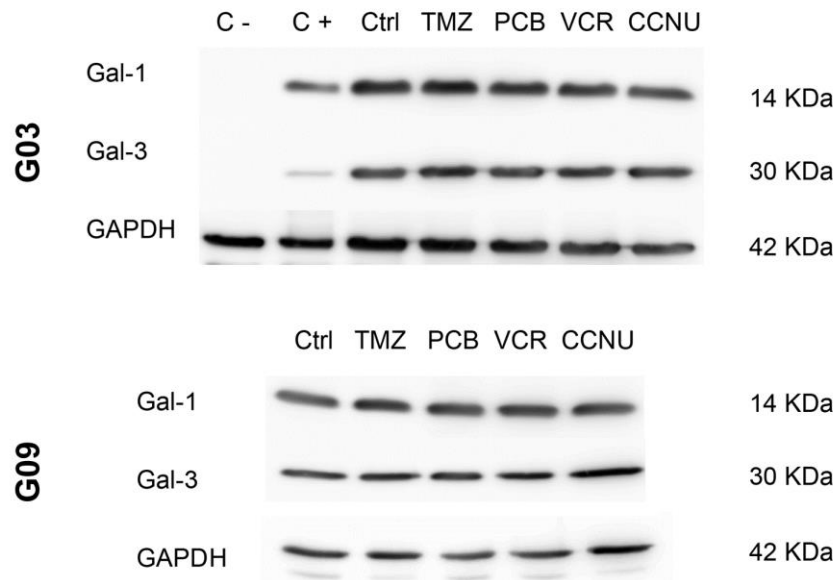


Figura 10. (A) Determinación de los niveles proteicos de Gal-1 y Gal-3 en ambas líneas celulares mediante Western blot. Los niveles de expresión de GAPDH fueron utilizados como controles de carga. Las intensidades de las bandas de Gal-1, Gal-3 y GAPDH fueron cuantificadas por densitometría. Todos los valores son relativos a la expresión de células sin tratar, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. *P < 0,05; **P < 0,01. (B) Imagen representativa de unos de los ensayos de Western blot. Nótese la obtención de las bandas esperadas en las calles control (C- y C+).

Es interesante observar que si bien los tratamientos con TMZ y CCNU producen cambios similares en la secreción de ambas galectinas, el tratamiento con VCR incrementa la secreción de Gal-1, pero no la de Gal-3.

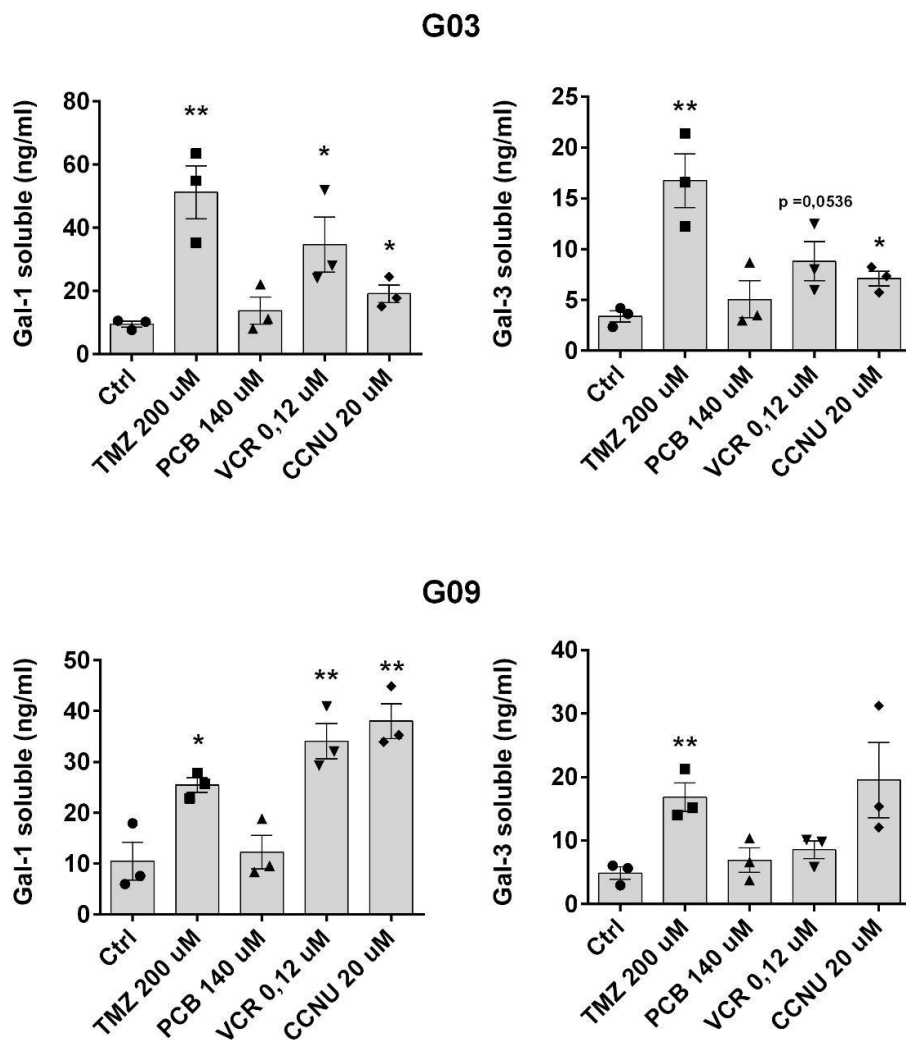


Figura 11. Determinación de los niveles proteicos solubles de Gal-1 y Gal-3 secretados por ambas líneas celulares mediante ensayos de ELISA. El número final de células por pocillo se utilizó para normalizar los resultados. En todos los casos se realizó una prueba *t* de *Student* para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones determinadas en células sin tratar y tratadas con los respectivos agentes quimioterapéuticos. *P < 0,05; **P < 0,01.

- Los siRNAs específicos para Gal-1 y Gal-3 empleados reducen significativamente los niveles de expresión de los transcritos correspondientes

Después de establecer el efecto de los agentes quimioterapéuticos en los niveles de expresión y secreción de Gal-1 y Gal-3, decidimos explorar la contribución de estas lectinas en la viabilidad celular de ambas líneas de CMG. Para ello, en primer lugar confirmamos la eficacia del silenciamiento génico utilizando siRNAs específicos para Gal-1 y Gal-3 en la línea de CMG G09 (Figura 12).

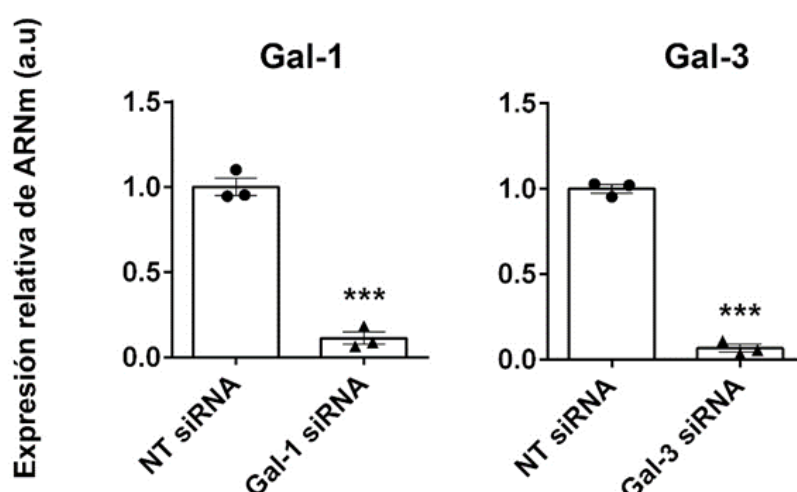


Figura 12. Niveles de expresión de los transcritos de Gal-1 y Gal-3 mediante RT-PCR en tiempo real en la línea G09 luego de 48 hs post-transfección con los respectivos siRNAs. Los valores fueron normalizados contra los niveles de expresión de RPL7. Todos los valores son relativos a la expresión de células no silenciadas (transfectadas con secuencias inespecíficas, NT), fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. En todos los casos se realizó una prueba *t* de *Student* para evaluar diferencias significativas entre la expresión de transcritos de Gal-1 y Gal-3 en células no silenciadas y silenciadas (***P* < 0,001).

- El efecto del silenciamiento de Gal-1 sobre la viabilidad de CMG depende del agente quimioterapéutico empleado

Como se mencionó anteriormente, el silenciamiento de Gal-1 conlleva un aumento significativo de la muerte celular en condiciones basales en la línea celular G09 y en respuesta al tratamiento con TMZ tanto en la línea G09 como en la línea G03, mientras que el de Gal-3 no produce cambios en la viabilidad de estas células. Sin embargo, el silenciamiento simultáneo de ambas galectinas no afecta la viabilidad celular, es decir, el silenciamiento combinado de estas galectinas anula el aumento de la muerte celular causada por el silenciamiento de Gal-1 (Figura 7). Estos resultados sugieren que los efectos anti-apoptóticos de Gal-1 dependen de la expresión de Gal-3. Además, considerando que los tratamientos con TMZ y CCNU producen cambios similares en las concentraciones extracelulares de ambas galectinas, pero el tratamiento con VCR incrementa sólo la de Gal-1, decidimos evaluar el rol de Gal-1 y Gal-3 en el control de la viabilidad de CMG en presencia de esta droga. Para ello, luego de silenciar Gal-1, Gal-3 o ambas en simultáneo con los respectivos siRNAs, cuantificamos la muerte celular determinando el porcentaje de células IP positivas en las líneas G03 y G09 expuestas o no a VCR durante 72 hs. En paralelo, realizando este mismo ensayo, tanto en ausencia de quimioterapéuticos como en presencia de TMZ, pudimos confirmar los resultados previos del laboratorio (descritos en la figura 7).

Como se observa en la figura 13, el silenciamiento de Gal-1 en presencia de VCR no conllevó cambios significativos en la viabilidad en ninguna de las dos líneas de CMG evaluadas. En cuanto al silenciamiento de Gal-3 y el de ambas lectinas en simultáneo, al igual que en ausencia de quimioterapéuticos y en presencia de TMZ, no observamos diferencias significativas en la muerte celular.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el efecto protector de Gal-1 sobre la viabilidad de CMG puede variar por de la presencia de drogas antineoplásicas, lo cual podría tener implicancias en tratamientos experimentales en donde se busque combinar agentes quimioterapéuticos con tratamientos que modulen la actividad de las galectinas.

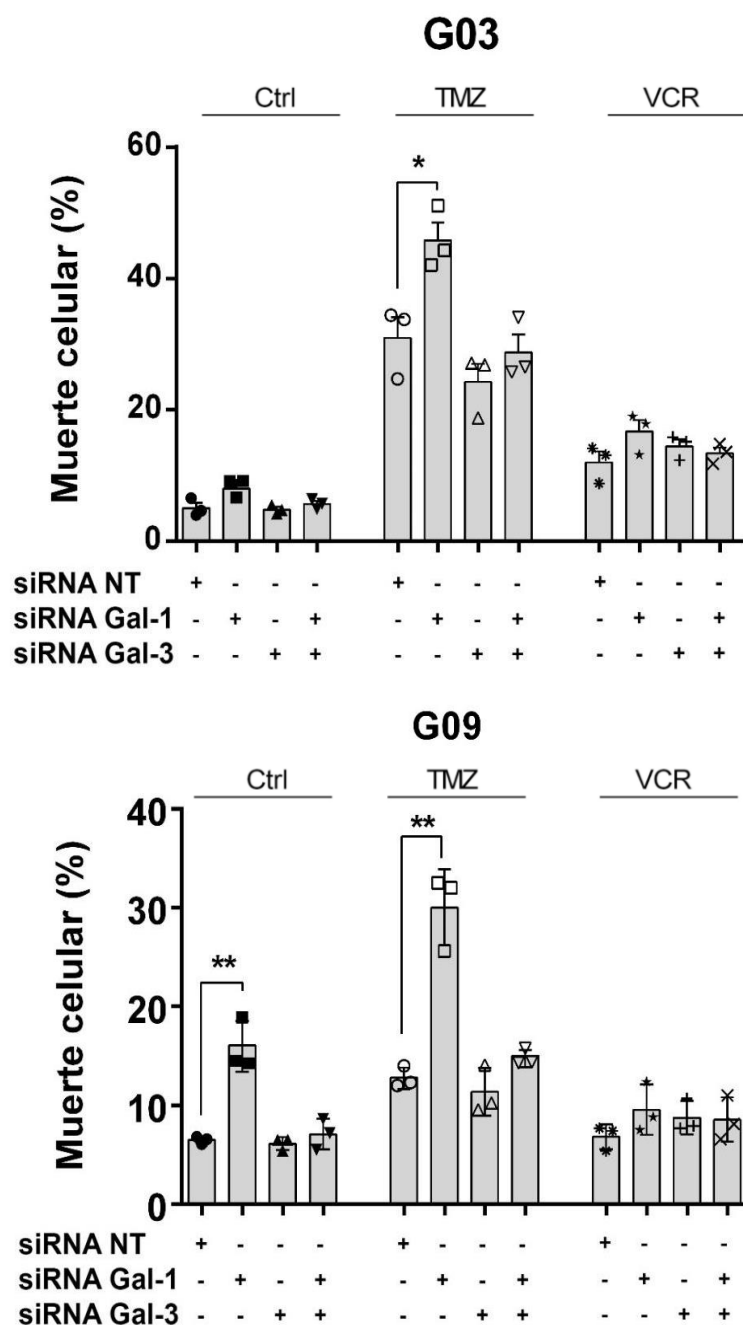


Figura 13. Participación de Gal-1 y Gal-3 en el control de la viabilidad de CMG. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células muertas marcadas con Ioduro de propidio (IP+) luego de silenciar o no Gal-1, Gal-3 o ambas de manera simultánea, en ausencia o presencia de TMZ o VCR durante 72 hs. Los gráficos de barras muestran la media \pm E.S. de tres experimentos. Se realizó la prueba *t* de Student para detectar diferencias significativas. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

Discusión y conclusiones

A pesar de los importantes avances científicos de las últimas décadas, tanto en la prevención y diagnóstico, como en el tratamiento del cáncer, los pacientes con gliomas de alto grado siguen presentando una supervivencia a 5 años menor al 5%⁸. La elevada quimio-resistencia de los GBM es una de las razones más importantes que explican este fracaso terapéutico, siendo las CMG responsables, en gran medida, de esta resistencia⁵⁷. Otra característica importante de los gliomas de alto grado es su elevada heterogeneidad inter-tumoral. Por el contrario, en relación a su respuesta terapéutica, estos tumores son altamente homogéneos; es decir, en prácticamente todos los casos la recurrencia tumoral y la muerte de los pacientes es inevitable^{1,3}.

El desarrollo de una metodología de cultivo de células derivadas de pacientes con fenotipo de CMG ha representado un importante avance, ya que ha permitido lidiar con muchas de las características que vuelven a estos tumores tan letales. En primer lugar, de todos los tipos celulares que conforman el tumor, las CMG son las células que resultarían más resistentes a morir con los tratamientos. Entonces, caracterizar en distintas líneas de CMG derivadas de pacientes las firmas transcripcionales y los niveles de expresión proteica de ciertas proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia, control de la viabilidad y apoptosis en respuesta a agentes quimioterapéuticos sentará las bases para desarrollar terapias más efectivas^{57,62}. Además, debido a la relativamente alta eficiencia para establecer estos cultivos, es posible contar con múltiples líneas derivadas de pacientes, pudiendo sortear así, los inconvenientes que plantea la elevada heterogeneidad inter-tumoral. En este sentido, las investigaciones traslacionales enmarcadas en la medicina personalizada resultarán fundamentales para poder desarrollar terapias a medida dirigidas a interferir en los mecanismos de resistencia particulares de cada tumor. De este modo, el hecho de contar en nuestro laboratorio con distintas líneas de CMG derivadas de pacientes nos brinda una gran oportunidad para profundizar el conocimiento de la biología de las mismas.

En este trabajo, utilizando dos líneas de CMG derivadas de pacientes, pudimos determinar que la secreción de Gal-1 y Gal-3 se ve afectada por distintos agentes quimioterapéuticos. Este resultado cobra relevancia al considerar las distintas funciones que pueden cumplir estas lectinas sobre los diferentes tipos celulares presentes en el microambiente tumoral. Por ejemplo, un incremento de las

concentraciones extracelulares de Gal-1 podría impactar sobre las células inmunes infiltrantes del tumor, suprimiendo las actividades anti-tumorales de linfocitos, macrófagos/microglia, células dendríticas, *natural killers* y otras²⁷⁻²⁹. Por su parte, Gal-3 podría inducir extracelularmente la apoptosis de células T⁶³. De hecho, también se ha demostrado que Gal-3 puede funcionar como ligando del punto de control inhibitorio inmunológico LAG3 suprimiendo la actividad de las células T CD8⁺ e inhibiendo la expansión de las células dendríticas plasmocitoides⁶⁴.

Las galectinas pueden controlar diferentes programas de muerte celular al interactuar con receptores glicosilados específicos presentes en las superficies celulares, o de manera intracelular, principalmente mediante interacciones proteína-proteína⁶⁵. Aunque las galectinas pueden promover o prevenir la muerte celular dependiendo de la localización celular o el contexto molecular, generalmente favorecen la supervivencia de las células cancerosas, lo que resulta en una mayor resistencia a los agentes antineoplásicos. Por ejemplo, Gal-1 promueve la quimio-resistencia en cáncer de ovario⁶⁶, carcinoma hepatocelular⁶⁷, leucemias⁶⁸ y cáncer de mama⁶⁹. De manera similar, Gal-3 protege diferentes tipos de células tumorales de la apoptosis⁷⁰⁻⁷². Sin embargo, como se mencionó anteriormente, Gal-3 extracelular puede ejercer funciones pro-apoptóticas⁶³.

Diversos estudios han demostrado que la disminución de Gal-1 favorece la muerte celular en gliomas y aumenta la quimio-sensibilidad. Por ejemplo, se ha reportado que el silenciamiento *in vitro* de Gal-1 incrementa la sensibilidad de las células de glioma U87MG al inhibidor de topoisomerasa SN-38, y que Gal-1 recombinante revierte parcialmente este efecto, indicando que Gal-1 protege a las células de glioma mediante un mecanismo extracelular⁷³. Le Mercier y colaboradores mostraron que TMZ aumenta la expresión de Gal-1 en la línea celular de glioma Hs683 y que la disminución de la expresión de esta lectina aumenta la sensibilidad a varios fármacos citotóxicos, incluidos CCNU, PCB y VCR. *In vivo*, se demostró que ratones con xenoinjertos ortotópicos de células U87MG tratados con TMZ y un siRNA anti-Gal-1 (administrado mediante nanopartículas) mostraron una mayor supervivencia en comparación con los ratones tratados sólo con TMZ⁷⁴.

Evidencias recientes demostraron que Gal-3 también controla la supervivencia de las células de glioma. Por ejemplo, se observó que la expresión de Gal-3 confiere radio- y quimio-resistencia en las líneas celulares T98G y U251 de GBM⁷⁵. Además, se reportó una elevada expresión de Gal-3 en pseudopalisadas⁷⁶, que son regiones que

comprenden células que migran activamente lejos de focos hipóxicos o necróticos, y se demostró, de hecho, que la hipoxia induce la expresión de Gal-3, lo que protegería a las células de glioma de la muerte celular inducida por la falta de oxígeno y nutrientes⁷⁷.

Nuestros resultados respecto al rol de Gal-1 en la supervivencia de células tumorales, particularmente de gliomas, coinciden con lo reportado previamente, en donde esta lectina estaría ejerciendo funciones anti-apoptóticas. Sin embargo, para el caso de Gal-3, no hemos observado que esta proteína cumpla funciones anti-apoptóticas. De hecho, el silenciamiento dual de Gal-1 y Gal-3 revirtió el aumento de la muerte celular causada por el silenciamiento de Gal-1, sugiriendo que el rol anti-apoptótico de Gal-1 depende de los niveles de expresión de Gal-3. Estos resultados, si bien son preliminares, podrían explicarse al considerar un modelo hipotético en el cual la relación o el balance entre la expresión extracelular de Gal-1 y Gal-3 sería determinante para el control de la supervivencia de las CMG. Por ejemplo, en este modelo, Gal-1 podría tener como función desplazar a Gal-3 de una interacción con una proteína de superficie que desencadene programas de muerte celular. En este escenario, una relación Gal-1/Gal-3 elevada prevendría la muerte celular, ya que Gal-1 desplazaría a Gal-3. Por el contrario, una disminución de este cociente (por ejemplo como consecuencia del silenciamiento de Gal-1), favorecería la unión de Gal-3 al receptor que, hipotéticamente, sería capaz de desencadenar la muerte celular.

Este modelo permitiría comprender por qué el tratamiento con VCR evita que el silenciamiento de Gal-1 induzca un aumento significativo de la muerte celular en CMG, ya que este agente quimioterapéutico induce un aumento de Gal-1 extracelular pero no de Gal-3. Es decir, los niveles de Gal-1 permanecerían lo suficientemente elevados como para desplazar a Gal-3, incluso luego del silenciamiento de Gal-1. La TMZ en cambio, si bien promueve un aumento marcado de la secreción de Gal-1, también lo hace con la de Gal-3. Por lo tanto, en este contexto, la relación Gal-1/Gal-3 se mantiene similar a la presente en condiciones basales (sin tratamientos).

La validación de este modelo con otros agentes o condiciones experimentales abriría la posibilidad de sensibilizar a las CMG frente a tratamientos antineoplásicos al modular diferencialmente la abundancia extracelular de Gal-1 y Gal-3. Así, tratamientos que provoquen el efecto inverso al de la VCR, es decir, que disminuyan la cantidad de Gal-1 extracelular y aumenten (o al menos no modifiquen) la de Gal-3, podrían promover la apoptosis inducida por la combinación del bloqueo extracelular

Gal-1 (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos neutralizantes anti-Gal-1) con agentes quimioterapéuticos pro-apoptóticos.

En conclusión, en este trabajo pudimos analizar por primera vez el efecto de diferentes agentes quimioterapéuticos de uso clínico en la expresión y la secreción de Gal-1 y Gal-3 en CMG derivadas de pacientes. También pudimos demostrar que si bien el silenciamiento de Gal-1 puede afectar la viabilidad de estas células, dichos tratamientos quimioterapéuticos son capaces de afectar la relevancia de estas lectinas sobre la viabilidad de las CMG. Dado que tanto Gal-1 como Gal-3 no sólo son capaces de favorecer la progresión tumoral al favorecer procesos celulares en las células tumorales, sino que también son potentes reguladores de las respuestas inmunológicas anti-tumorales, profundizar el estudio de sus mecanismos de acción podría facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas en estos letales tumores.

Referencias

1. Whitfield, B. T. & Huse, J. T. Classification of adult- type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathol.* 32, e13062 (2022).
2. Van Den Bent, M. J. *et al.* Primary brain tumours in adults. *The Lancet* 402, 1564–1579 (2023).
3. Becker, A., Sells, B., Haque, S. & Chakravarti, A. Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Cancers* 13, 761 (2021).
4. Stupp, R., *et al.*, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. 352(10): p. 987-96.
5. Khasraw, M. and A.B. Lassman, *Advances in the treatment of malignant gliomas*. *Curr Oncol Rep*, 2010. 12(1): p. 26-33.
6. Videla-Richardson, G. A., *et al.*, Galectins as emerging glyco-checkpoints and therapeutic targets in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 23(1), 316.
7. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. *Am J Pathol*, 2007. 170(5): p. 1445-53.
8. Louis, D.N., *et al.*, *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. 131(6): p. 803-20.
9. Guo, X. *et al.* Histological and molecular glioblastoma, IDH-wildtype: a real-world landscape using the 2021 WHO classification of central nervous system tumors. *Front. Oncol.* 13, 1200815 (2023).
10. Galli, R. *et al.* Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* 64, 7011–7021 (2004).
11. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401 (2004).
12. Goodenberger, M.L. and R.B. Jenkins, *Genetics of adult glioma*. *Cancer Genet*, 2012. 205(12): p. 613-21.
13. Videla Richardson, G. A. *et al.* Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 26, 43–61 (2016).
14. Vera, M. B. *et al.* Noxa and Mcl-1 expression influence the sensitivity to BH3-mimetics that target Bcl-xL in patient-derived glioma stem cells. *Sci. Rep.* 12, 17729 (2022).
15. Morris-Hanon, O. *et al.* The Cell Cycle Inhibitors p21 Cip1 and p27 Kip1 Control Proliferation but Enhance DNA Damage Resistance of Glioma Stem Cells. *Neoplasia* 19, 519–529 (2017).
16. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760 (2006).
17. Bleau, A.-M. *et al.* PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* 4, 226–235 (2009).
18. Pàez-Ribes, M. *et al.* Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 15, 220–231 (2009).
19. Rahman, R., Smith, S., Rahman, C. & Grundy, R. Antiangiogenic Therapy and Mechanisms of Tumor Resistance in Malignant Glioma. *J. Oncol.* 2010, 1–16 (2010).
20. Pollard, S. M. *et al.* Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580 (2009).

21. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391–403 (2006)
22. Mitchell, K., Troike, K., Silver, D. J., & Lathia, J. D. (2021). The evolution of the cancer stem cell state in glioblastoma: emerging insights into the next generation of functional interactions. *Neuro-Oncology*, 23(2), 199–213.
23. Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D., & Rich, J. N. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & Development*, 33(11–12), 591–609.
24. Li, X. *et al.* Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology* 11 (2018).
25. Sampson, J. *et al.* Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nature reviews. Cancer* 20, 12–25 (2020)
26. Bonaventura, P. *et al.* Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 10, 168 (2019).
27. Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*, 19(1), 20–27 (2016).
28. DeNardo, D. *et al.* Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat rev Immunology* 19, 369–382 (2019).
29. Chao, M. *et al.* Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142, 699–713 (2010)
30. Liu, F.-T. & Rabinovich, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5, 29–41 (2005).
31. Di Lella, S. *et al.* When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. *Biochemistry* 50, 7842–7857 (2011).
32. Troncoso, M. F. *et al.* The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease. *J. Biol. Chem.* 299, 105400 (2023).
33. Mariño, K. V., Cagnoni, A. J., Croci, D. O. & Rabinovich, G. A. Targeting galectin-driven regulatory circuits in cancer and fibrosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 22, 295–316 (2023)
34. Rubinstein, N. *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection. *Cancer Cell* 5, 241–251 (2004).
35. Croci, D. O. *et al.* Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 209, 1985–2000 (2012).
36. Girotti, M. R., Salatino, M., Dalotto-Moreno, T. & Rabinovich, G. A. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J. Exp. Med.* 217, e20182041 (2020).
37. Croci, D. O. *et al.* Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell* 156, 744–758 (2014).
38. He, X. *et al.* Expression of galectin- 1 in carcinoma- associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion through upregulation of integrin β 1. *Cancer Sci.* 105, 1402–1410 (2014).

39. Rizqiawan, A. *et al.* Autocrine galectin-1 promotes collective cell migration of squamous cell carcinoma cells through up-regulation of distinct integrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 904–910 (2013).
40. Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R. & Rabinovich, G. A. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1679–1700 (2007).
41. Díaz-Alvarez, L., & Ortega, E. (2017). The many roles of galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Mediators of Inflammation*, 2017, 9247574.
42. Farhad, M., Rolig, A. S., & Redmond, W. L. (2018). The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 7(6), e1434467.
43. Wang, Y. G. *et al.* Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression. *Experimental & molecular medicine* 44, 387-393 (2012).
44. Kobayashi, T., *etal.*, Transient gene silencing of galectin- 3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of β - catenin. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 2011. 129(12), 2775–2786.
45. Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. & Brat, D. J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 529-539 (2006).
46. Camby, I. *et al.* Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol* 11, 12-26 (2001).
47. Rorive, S. *et al.* Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia* 33, 241-255 (2001).
48. Yamaoka, K. *et al.* Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *Journal of neuroscience research* 59, 722-730 (2000).
49. Lahm, H. *et al.* Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *Journal of cancer research and clinical oncology* 127, 375-386 (2001).
50. Camby, I. *et al.* Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61, 585-596 (2002).
51. Jung, T. Y. *et al.* Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *Journal of neurosurgery* 109, 273-284, 2008.
52. Toussaint, L. G., 3rd *et al.* Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Molecular cancer* 11, 32, 2012.
53. Strik, H. M. *et al.* Galectin-1 expression in human glioma cells: modulation by ionizing radiation and effects on tumor cell proliferation and migration. *Oncology reports* 18, 483-488 (2007).
54. Le Mercier, M. *et al.* Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicology and applied pharmacology* 229, 172-183, 2008.

55. Le Mercier, M. et al. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 456-469, 2008.
56. Ikemori, R. Y. et al. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival. *PloS one* 9, e111592, 2014.
57. Zhou, B.B., et al., Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(10):806-23.
58. Zhu, Z., et al., Targeting self-renewal in high-grade brain tumors leads to loss of brain tumor stem cells and prolonged survival. *Cell Stem Cell*, 2014. 15(2): p. 185-98.
59. Ostermann, S., et al., Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2004. 10(11), 3728–3736.
60. Ou, A., et al., Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 22(1).
61. Portnow, J., et al., The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2009. 15(22), 7092–7098.
62. Martini, M., et al., *Targeted therapies: how personal should we go?* *Nat Rev Clin Oncol*, 2011. 9(2): p. 87-97.
63. Fukumori, T., et al., CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Research*, 2003. 63(23), 8302–8311.
64. Kouo, T., et al., Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8+ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunology Research*, 2015. 3(4), 412–423.
65. Girotti, M.R., et al., Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J. Exp. Med*, 2020. 217, e20182041.
66. Zhang, P., et al., Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis*, 2014. 5, e991.
67. Su, Y.-C., et al., Galectin-1-Induced Autophagy Facilitates Cisplatin Resistance of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*, 2016. 11, e0148408.
68. Luo, W., et al., Identification of galectin-1 as a novel mediator for chemoresistance in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 2016. 7, 26709–26723.
69. Nam, K., et al., Binding of galectin-1 to integrin beta1 potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells. *Oncotarget*, 2017. 8, 35804–35823.
70. Mazurek, N., et al., Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ*, 2012. 19, 523–533.
71. Hoyer, K.K., et al., An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am. J. Pathol*, 2004. 164, 893–902.
72. Cai, G., et al., Galectin-3 induces ovarian cancer cell survival and chemoresistance via TLR4 signaling activation. *Tumor Biol*, 2016. 37, 11883–11891.

- 73.**Puchades, M., et al., Proteomic investigation of glioblastoma cell lines treated with wild-type p53 and cytotoxic chemotherapy demonstrates an association between galectin-1 and p53 expression. *J. Proteome Res*, 2007. 6, 869–875.
- 74.**Danhier, F., et al., Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: In vivo evaluation. *Int. J. Pharm*, 2015. 481, 154–161.
- 75.**Wang, H., et al., Promotes Treatment Resistance in Glioblastoma and Is Associated with Tumor Risk and Prognosis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*, 2019. 28, 760–769.
- 76.**Ikemori, R.Y., et al., Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival. *PLoS ONE*, 2014. 9, e111592.
- 77.**Brat, D.J., et al., Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*, 2004. 64, 920–927.